

# **Effektoren fehlregulierter STAT3-Aktivität im kolorektalen Karzinom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Anne Marie Katrien Rauschel (geb. Schmitz)  
geboren am 16. August 1985 in Den Helder (NL)

Angefertigt am Institut für Biochemie II der Friedrich Schiller Universität Jena

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Karlheinz Friedrich

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Karlheinz Friedrich Friedrich Schiller Universität -Institut für Biochemie II
2. PD Dr. Stefan Feller Universität Oxford (GB)
3. Prof. Dr. Klaus Höffken Universitätsklinikum Jena (Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstandes)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.06.2009

Tag des mündlichen Examens: 06./07.06.2012

*Meinen Lieben*

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AC	Adenylatcyclase
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Datenbank
Bis	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CIS-1	<i>Cytokine Inducible SH2-domain Containing Protein</i>
CRC	<i>Colorectal Carcinoma</i>
CRE	cAMP-responsives Element
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i> , Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsh	<i>Dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FKS	Fetales Kälberserum
G	Differenzierungsgrad/ Malignitätsgrad
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GSK3	Glycogensynthasekinase-3
HE	Hämatoxylin/ Eosin
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
Lef	<i>Late Expression Factor</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MCC	<i>Mutated in Colorectal Cancer</i> , Gen

## Abkürzungsverzeichnis

---

MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
PK1	Phosphatidylinositol abhängige Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PRL	Prolaktin
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHP	<i>SH2 Domain Containing Phosphatase</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
Src	<i>Rous sarcoma virus</i>
st	Randgewebe
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
Tcf	<i>Transcription Factor 1</i>
TEMED	N`N`N`N-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNM	T- Primärtumor N- regionale Metastasen der Noduli lymphatici M- Fernmetastasen
tt	Tumorgewebe
Tyk	Tyrosinkinase
tyr	Tyrosin
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 1</i>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	- 1 -
<b>2. Einleitung</b>	- 2 -
2.1 Das kolorektale Karzinom und seine Relevanz in der Klinik	- 2 -
2.1.1 Epidemiologie und Demographie	- 2 -
2.1.2 Ätiologie	- 2 -
2.1.3 Klassifikationen	- 3 -
2.1.3.1 Differenzierungsgrad (Grading)	- 3 -
2.1.3.2 TNM-Klassifikation	- 3 -
2.1.4 Metastasierung	- 4 -
2.1.5 Prognose	- 5 -
2.1.6 Therapie	- 5 -
2.1.6.1 Die konventionelle Chemotherapie	- 5 -
2.2 Molekulare Mechanismen der Tumorigenese im CRC	- 6 -
2.2.1 Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz	- 6 -
2.2.2 Neue Substanzgruppen in der Therapie des metastasierten Stadiums	- 9 -
2.2.3 JAK-STAT-Signalweg	- 10 -
2.2.4 STAT3 - ein Transkriptionsfaktor mit onkogenen Eigenschaften	- 13 -
2.2.5 STAT3-Inhibitoren	- 15 -
2.2.6 Funktionen von Komponenten des JAK/STAT Signalweges und seines Umfeldes in der Onkogenese	- 16 -
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	- 18 -
<b>4. Materialien und Methodik</b>	- 19 -
4.1 Materialien	- 19 -
4.1.1 Verwendete Zellen und Medien	- 19 -
4.1.2 Antikörper	- 21 -
4.1.3 Inhibitoren	- 22 -
4.1.4 Chemikalien / Feinchemikalien / Kits	- 22 -
4.1.5 Puffer und Lösungen	- 23 -
4.1.6 Verwendete Geräte, Materialien und Programme	- 24 -
4.1.7 Verwendetes Biopsiematerial	- 25 -
4.2 Methoden	- 26 -
4.2.1 Zellbiologische Methoden	- 26 -
4.2.1.1 Kultivierung und Passagierung von Zellen	- 26 -
4.2.1.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen	- 26 -
4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl einer Kultur	- 26 -
4.2.1.4 Inhibition von Zellen	- 27 -
4.2.1.5 Proliferationsassay	- 27 -
4.2.1.6 LDH-Test	- 27 -
4.2.2 Proteinbiochemische Methoden	- 28 -
4.2.2.1 Zelllyse	- 28 -
4.2.2.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	- 28 -
4.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 28 -
4.2.2.4 Western Blot	- 29 -
4.2.2.5 Immunodetektion	- 30 -
4.2.2.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran mit $\beta$ -Mercaptoethanol)	- 30 -
4.2.3 Methoden zur statistischen Auswertung	- 31 -
4.2.3.1 Quantifizierung der Bandenschwärzung	- 31 -
4.2.3.2 Korrelationsanalyse	- 31 -
4.2.3.3 Abhängigkeitsanalyse	- 32 -

<b>5. Ergebnisse</b>	- 33 -
5.1 Untersuchungen zur Aktivität verschiedener Mediatoren der STAT3-Signalaktivität in Tumorbiopsien kolorektaler Karzinompatienten	- 33 -
5.1.1 Analyse der STAT3-Aktivierung in Biopsiematerial von Kolorektalkarzinomen	- 33 -
5.1.2 Übersicht über die globale Tyrosinphosphorylierung in kolorektalen Biopsien	- 35 -
5.1.3 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung potentieller Mediatoren der STAT3-Aktivität	- 37 -
5.1.4 Korrelationsanalyse zum Aktivierungsstatus verschiedener potentieller STAT3 assoziierter Signalmoleküle	- 39 -
5.1.5 Überprüfung zur statistischen Abhängigkeit der Signalaktivität vom Tumorgrad (G1-G4)	- 41 -
5.1.6 Unterschiede im Aktivierungsstatus zwischen Rand- und Tumorgewebe	- 41 -
5.2 Untersuchung zur Aktivität verschiedener Mediatoren der STAT3-Signalaktivität in Lysaten permanenter Kolonkarzinom (CRC-) Zelllinien	- 42 -
5.2.1 Analyse der STAT3-Aktivierung in Lysaten CRC-abgeleiteter Zelllinien	- 42 -
5.2.2 Übersicht über die globale Tyrosinphosphorylierung in Lysaten von CRC-Zelllinien	- 44 -
5.2.3 Untersuchung der Signalaktivität potentieller Mediatoren der STAT3-Aktivität in Lysaten von CRC-Zelllinien	- 45 -
5.2.4 Statistische Analyse möglicher gegenseitiger Abhängigkeiten der Expression bzw. Tyrosinphosphorylierung von Signalmediatoren in CRC-Zelllinien	- 49 -
5.3 Untersuchung von STAT3-assoziierten Signalwegen in der Kolonkarzinom Zelllinie C-10	- 50 -
5.3.1 Inhibition von STAT3	- 50 -
5.3.2 Inhibition von Src	- 52 -
5.3.3 Inhibition von Januskinasen	- 53 -
<b>6. Diskussion</b>	- 55 -
6.1 STAT3-Aktivität in Tumor- und nicht entartetem Randgewebe des kolorektalen Karzinoms	- 55 -
6.2 Mechanismen der STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom	- 58 -
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	- 63 -
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	- 65 -
<b>9. Anhang</b>	- 73 -

## 1. Zusammenfassung

Für ein physiologisches Zellverhalten sind spezielle Signalprozesse von essentieller Bedeutung. Dazu gehört unter anderen der JAK/STAT-Signalweg, der eine Art der rezeptorvermittelten Aktivierung intrazellulärer Mediatoren mit Fortleitung des Signals in den Zellkern darstellt. Dieser ist in den letzten Jahren auf Grund seiner Relevanz in der Tumorigenese mehr und mehr in das Blickfeld der Forschung gerückt. STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) regulieren dabei wichtige zelluläre Prozesse wie Apoptose, Differenzierung und Proliferation. Nicht verwunderlich ist daher, dass eine Fehlregulation dieser Proteine zur Tumorentwicklung beitragen kann. Vor allem in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms (CRC) kommt dabei speziell STAT3 eine große Bedeutung zu, da es malignitätsrelevante Einflüsse auf Tumorzellen besitzt.

Wegen seiner Überaktivität in zahlreichen Tumoren erscheint STAT3 als ein attraktiver Angriffspunkt für die molekulare Krebstherapie.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Signalmediatoren für die beschriebene konstitutive STAT3-Aktivität im CRC verantwortlich sind. Dazu wurden Kollektionen von CRC-Biopsien und -Zelllinien per Western Blot auf ihre STAT3-Aktivität und die Aktivität potenziell vorgeschalteter Signalmediatoren untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass STAT3 sowohl in der Mehrzahl der Biopsien kolorektalen Tumor- wie auch nicht entarteten Randgewebes, aber auch in einigen CRC-Zelllinien aktiviert auftritt. Durch Korrelations- und Abhängigkeitsanalysen fiel auf, dass vor allem die Tyrosinkinasen Src und JAK2 mit verstärkter STAT3-Aktivität tendenziell funktionell assoziiert sind. Daher wurden beispielhaft Inhibitionsexperimente an der CRC-Zelllinie C-10 mit spezifischen Hemmstoffen für STAT3, Src und die Januskinasen durchgeführt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass in den C-10-Zellen offenbar Januskinasen für die STAT3-Phosphorylierung verantwortlich sind, was jedoch ohne Folge für die Zellintegrität oder das Zellwachstum blieb. Eine direkte Inhibition der STAT3-Dimerisierung durch ein kompetitives Peptid führte hingegen zum kompletten Verlust der Zellintegrität und zum Absterben der Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass selbst unphosphoryliertes STAT3 Funktionen in Tumorzellen ausübt, die dem Zelltod entgegenwirken. Ein Fehlen der STAT3-Dimerisierung jedoch bewirkt ein Absterben der C-10-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass STAT3 ein interessantes und wichtiges Zielmolekül in der Entwicklung neuer Signaltransduktionstherapeutika zur Bekämpfung des kolorektalen Karzinoms darstellt.



## **2. Einleitung**

### **2.1 Das kolorektale Karzinom und seine Relevanz in der Klinik**

Bösartige Tumorerkrankungen des Dick- und Mastdarmes werden unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (CRC) zusammengefasst. Eine Vielzahl bemerkenswerter Forschungsergebnisse hat im Laufe der Zeit das Verständnis der Entstehung und Auswirkung dieser Erkrankung wesentlich geprägt. Die Möglichkeiten der modernen Tumorthherapie wurden durch diese Erkenntnisse entscheidend beeinflusst und spiegeln sich bei beiden Geschlechtern in einem Rückgang der Sterberaten und verlängerten 5-Jahres-Überlebensraten wieder.

#### **2.1.1 Epidemiologie und Demographie**

Das CRC ist eine besonders intensiv beforschte Erkrankung und beispielhaft für solide Tumoren. Die Neuerkrankungsrate (Inzidenz) des CRC in der BRD für Männer wird auf über 37.000 und Frauen auf etwa 36.000 pro Jahr geschätzt, wobei die Inzidenz mit dem Alter zunimmt. Damit ist es bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung, nach dem Prostatakarzinom des Mannes und dem Mammakarzinom der Frau.

Zudem ist das kolorektale Karzinom derzeit die zweithäufigste Krebstodesursache für Männer wie auch Frauen, jedoch nehmen die Sterberaten für beide Geschlechter stetig ab.

Das mittlere Erkrankungsalter für Männer liegt bei 69, für Frauen bei 75 Jahren.

Bei der sehr seltenen erblichen familiären adenomatösen Polyposis (FAP), sowie dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Krebsyndrom (HNPCC) treten mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits in jüngeren Jahren Darmkrebsfälle in den betroffenen Familien auf (Robert Koch Institut 2008).

#### **2.1.2 Ätiologie**

Überdurchschnittlich häufig sind Verwandte ersten Grades von CRC-Patienten vom kolorektalen Karzinom betroffen, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob dies Genveränderungen oder einem ähnlichen Lebensstil zuzuschreiben ist. In geringerem Maße erhöhen auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie die *Colitis ulcerosa* und andere Tumorerkrankungen das Krebsrisiko. Zudem tragen diätetische Einflüsse, sowie

Bewegungsmangel und Übergewicht zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei (Robert Koch Institut 2008).

Zu wesentlichen Erkenntnissen über die Tumorentstehung haben Untersuchungen an den erblichen Syndromen wie der FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) und dem HNPCC (Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom) geführt, obwohl sie nur etwa 5% aller Dickdarmtumoren verursachen (Schmiegel 1999).

### 2.1.3 Klassifikationen

#### 2.1.3.1 Differenzierungsgrad (Grading)

Adenokarzinome und muzinöse Karzinome werden nach Ausprägung der Drüsenbildung, Kernpolymorphismen und Mitosen in vier durch die WHO festgelegte Differenzierungsgrade eingeteilt.

G1	gut differenziert	G3	schlecht differenziert
G2	mäßiggradig differenziert	G4	undifferenziert

G1 und G2 werden als niedrig maligne, G3 und G4 als hochmaligne zusammengefasst. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Zunahme des Differenzierungsgrades und der lymphogenen Metastasierung einerseits, sowie der Lokalrezidivrate andererseits. Der Differenzierungsgrad liefert somit Hinweise über die wahrscheinliche Tumorausbreitung zum Diagnosezeitpunkt und bestimmt damit maßgeblich die Prognose (Köhne 2001).

#### 2.1.3.2 TNM-Klassifikation

Eine genaue Einteilung der Tumorausbreitung erfolgt durch das von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) etablierten TNM-Systems. Hierbei beschreibt **T** die Infiltrationstiefe, **N** das Ausmaß der lymphogener Metastasierung und **M** das Vorliegen von Fernmetastasen. Der **R**-Status liefert Hinweise über die Situation des Residualtumors nach chirurgischer Therapie und beruht sowohl auf Aussagen des Operators aus klinischer Sicht als auch auf dem pathologischen Befund unter histologischem Aspekt. Der TNM-Status bestimmt das therapeutische Vorgehen (Köhne 2001).

**T Primärtumor**

- T0 kein Anhalt für Primärtumor
- Tis carcinoma in situ
- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T1 Tumor infiltriert die Submukosa
- T2 Tumor infiltriert die Muskularis propria
- T3 Tumor infiltriert die Muskularis propria  
in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches Gewebe
- T4 Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert direkt in  
andere Organe oder Strukturen oder andere Teile des Kolons

**N Regionäre Lymphknoten**

- N0 kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
- N1 Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
- N2 Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

**M Fernmetastasen**

- M0 keine Evidenz für Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen vorhanden
- MX Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

**R Residualtumor**

- R0 weder mikroskopisch noch makroskopisch Residualtumor
- R1 mikroskopisch nachzuweisender Residualtumor ohne klinisch/  
makroskopischen Tumorhinweis
- R2 makroskopisch feststellbarer Residualtumor

#### 2.1.4 Metastasierung

Zum Zeitpunkt ihrer Diagnose sind 15-20 % aller kolorektalen Karzinome bereits hämatogen oder lymphogen metastasiert.

Kolonkarzinome und solche im höher sitzendem Rektum führen aufgrund des venösen Abflusses über die Pfortader in erster Linie zu Lebermetastasen. Tiefere Rektumkarzinome können hingegen über die *Vena mesenterica inferior* pulmonal und in seltenen Fällen über das vertebrale Venengeflecht in die Wirbelsäule streuen. Kommt es zu einem Einbruch des Tumors in das Peritoneum erfolgt die Metastasierung abdominal *per continuitatem* (Wagner 1994).

### **2.1.5 Prognose**

Leider ist zurzeit eine definitive Heilung des CRC nur durch chirurgische Therapie in frühen Tumorstadien möglich. Nach einer R0 Resektion werden bei bis zu 2/3 der Patienten lokale, regionale oder Fernmetastasen auftreten (Seufferlein 2003). Die kumulierten relativen 5-Jahres-Überlebensraten liegen inzwischen für Männer und Frauen bei 60% (Robert Koch Institut 2008).

### **2.1.6 Therapie**

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms wird maßgeblich durch das Tumorstadium bestimmt. Eine kurative Zielsetzung erfordert immer die chirurgische Intervention, wobei je nach Lokalisation des Tumors der betreffende Darmabschnitt mit entsprechendem Abstand zum gesunden Gewebe reseziert werden muss. Durch adjuvante Chemotherapie postoperativ kann in fortgeschrittenem Stadium die Aussicht auf Heilung erheblich verbessert werden.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der Lebensqualität wird das metastasierte Kolonkarzinom palliativ mit Chemotherapeutika behandelt und je nach Krankheitsverlauf werden stenosierende Darmabschnitte und solitäre Metastasen reseziert (Köhne 2001).

#### **2.1.6.1 Die konventionelle Chemotherapie**

Im Verlauf der letzten 20 Jahre kam es zu großen Fortschritten in der chemotherapeutischen Behandlung des kolorektalen Karzinoms, wie zahlreiche Studien belegen. Dabei hat sich als effektivste Substanz der Thymidilatsynthaseinhibitor 5-Fluoruracil (5-FU) herauskristallisiert. 5-FU wird mit Folinsäure (FS) in unterschiedlichen Konzentrationen, je nach Therapieschema in seiner Wirkung moduliert wird (Francini et al. 1994, O'Connell et al. 1997). Eine Kombination mit dem interkalierenden Platinderivat Oxaliplatin hat zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebensraten geführt (André et al. 2004, Köhne C 2001).

Die Einführung neuer Substanzgruppen in der Therapie beruht auf molekularbiologischen Erkenntnissen über die Regulationsmechanismen des Tumorwachstums, darum finden sich Erläuterungen dazu im Anschluss an das Kapitel „Molekulare Mechanismen der Tumorigenese“.

## 2.2 Molekulare Mechanismen der Tumorigenese im CRC

Damit Zellen eines Gewebes untereinander, mit ihrer Umgebung und dem restlichen Organismus kommunizieren können, sind spezielle Signalprozesse notwendig, welche unter anderem durch Hormone und Zytokine (Gewebshormone) gesteuert werden.

Diese Abläufe, die Signaltransduktion, sind für jede Zelle durch ihren individuellen Rezeptorenbesatz und ihr genetisches Programm spezifisch und streng kontrolliert.

Essentielle Prozesse des Organismus wie Entwicklung, Differenzierung und der kontrollierte Zelltod (Apoptose), sowie globale Reaktionen wie die Immunantwort und die Entzündung werden durch sie geregelt.

Um ein physiologisches Verhalten der Zellen zu garantieren, müssen die auf die Zelle einwirkenden Signale durch eine korrekt ablaufende kaskadenartige Aktivierung intrazellulärer Mediatoren in den Zellkern weitergeleitet werden.

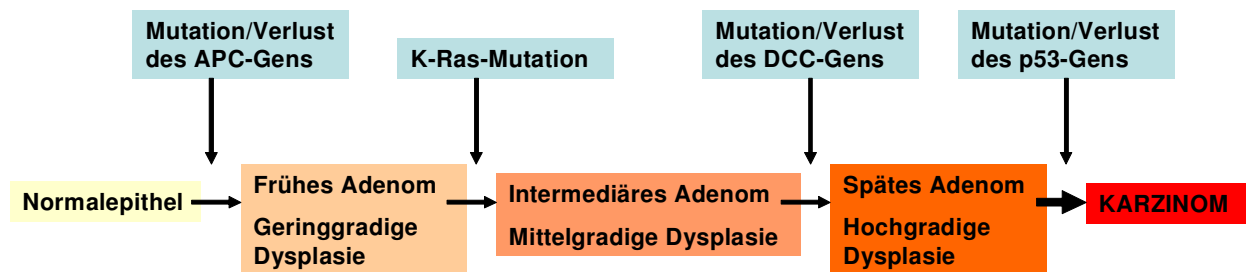
Eine fehlregulierte Aktivität vieler Signalmediatoren konnte häufig mit der Entwicklung maligner Zelleigenschaften wie unkontrollierter Proliferation, infiltrierendem Wachstum, Hemmung der Apoptose, Entdifferenzierung und Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Heinrich et al. 1998, Nicola 1994, Arai et al. 1990).

### 2.2.1 Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz

Für die Entstehung kolorektaler Karzinome sind Mutationen in mindestens sechs Genen nötig (Vogelstein et al. 1988). Dabei werden somatische Mutationen zum einen in zwei rezessiven Onkogenen (z.B. *ras*, *myc*, *src*, *erbB-2*) und zum anderen in vier dominanten Tumorsuppressorgenen (z.B. *apc*, *mcc*, *dcc*, *p53*) diskutiert (Goyette et al. 1992, Stanbridge 1990).

Zur Tumorausbildung können zudem chromosomale Deletionen und Methylierungsveränderungen beitragen. Die Instabilität der Mikrosatelliten (MSI), bei der die Mechanismen der DNA-Reparatur mutieren, ist ein weiterer Weg zur erhöhten Mutationsrate kolorektaler Karzinome (Buermeyer et al. 1999).

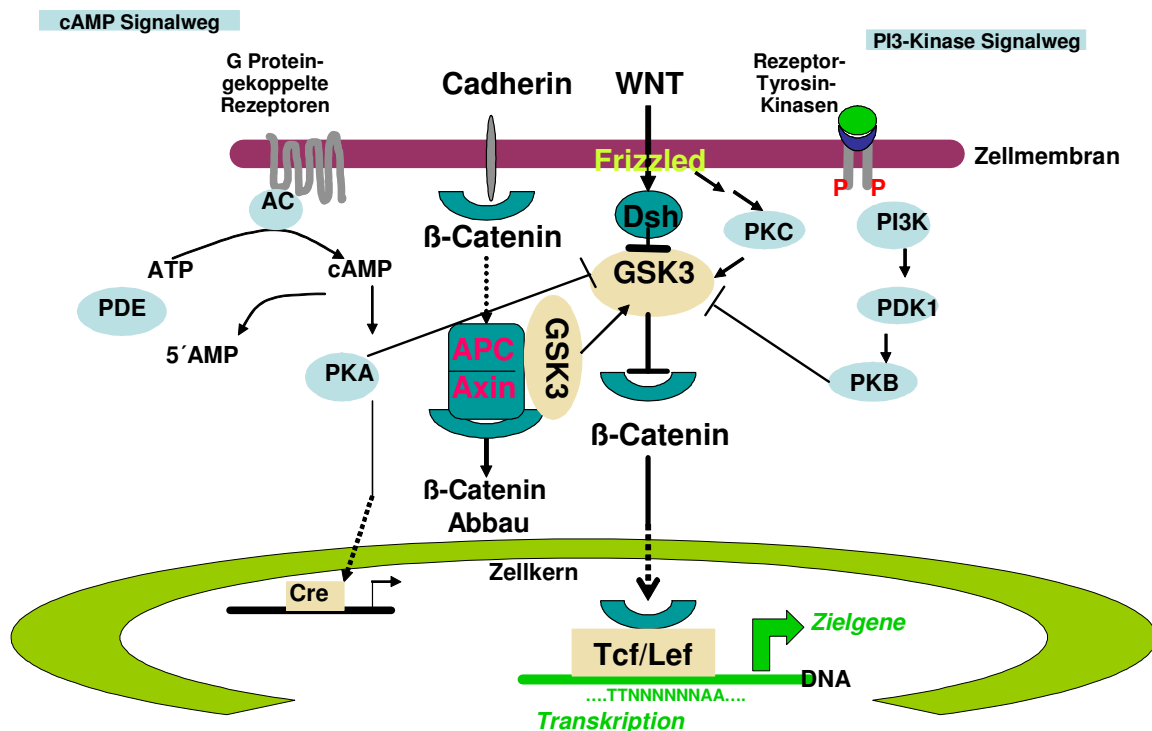
Die Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al. 1988) (Abb. 1) beschreibt das schrittweise Entstehen kolorektaler Karzinome aus normaler Darmschleimhaut. Es werden genetische Veränderungen in einer regelhaften Abfolge beobachtet, welche sich direkt mit histologisch morphologischen Korrelaten des Kolorektums verknüpfen lassen.



**Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz (modifiziert nach Kinzler und Vogelstein)**

Durch eine Mutation im *apc*-Gen entwickelt sich zunächst aus dem Normalepithel dysplastisch verändertes Darmschleimhautgewebe, welches sich über weitere Mutationen wie zum Beispiel von Ras zu einem adenomatösen Kolonpolypen (Adenom) entwickeln kann. Bei weiteren Veränderungen an einflussreichen Genen, wie z.B. dem *dcc* (*deleted in colorectal cancer*) und dem Tumorsuppressorgen *p53*, kann dieser Polyp karzinomatös entarten und die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen.

In 60-80% der Tumorpatienten wird die in der Literatur als „first hit“ beschriebene Mutation des Tumorsuppressorgens *apc* (Adenomatous polyposis coli) gefunden, dessen Genprodukt Teil des Wnt-Signalweges (Abb. 2) ist. Namensgebend für das *apc*-Gen wurde die Familiäre Adenomatosis polyposis Coli (FAP). Dies ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, in deren Verlauf sich hunderte bis tausende Kolonadenome bei dem betroffenen Patienten entwickeln, wobei das Entartungsrisiko bei 100 % liegt (Becker et al. 2002).



**Abb. 2: Wnt-Signalweg vereinfacht**

Durch Bindung eines Liganden (z.B. Wnt) an dem Rezeptor (z.B. Frizzled) steigt die intrazelluläre  $\beta$ -Cateninkonzentration, welche zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktorenkomplex Tcf/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) und damit zur vermehrten Expression der Zielgene (z.B. Cyclin D1, mehrere Matrixmetalloproteinasen und Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie) führt.

Das APC-Protein ist im Wnt-Signalweg (Abb. 2) für die Regulation des  $\beta$ -Cateninabbaus zuständig, so dass es infolge einer *apc*-Mutation zu einer erhöhten Transkription von Genen kommt, die durch die Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef gesteuert werden (Bienz 1999). Weitere Funktionen von APC sind die Zellzykluskontrolle (Narayan und Roy 2003) und die Steuerung der Migration der Epithelzellen während der Schleimhautregeneration. Mutationen führen daher zu einer Anhäufung der Zellen an der Kryptenbasis, weshalb sie als ursächlich für die Entstehung von adenomatösen Wachstumsformen beschrieben werden (Moss et al. 1996). Zudem führt ein *apc*-Gendefekt zu einem Polaritätsverlust transformierter Epithelzellen, da APC normalerweise über eine Bindung an Axin und  $\beta$ -Catenin das Zytoskelett und die intrazelluläre Adhäsion stabilisiert (Bright-Thomas und Hargest 2003). Ein unmittelbarer Zusammenhang besteht außerdem zwischen chromosomaler Instabilität (CIN), sowie der damit verbundenen Aneuploidie der Tumoren und *apc*-Mutationen, da APC während der

Mitose die Bindung zwischen den Mikrotubuli des Spindelapparates und den Kinetochoren der Chromosomen vermittelt (Fodde et al. 2001).

Die K-Ras(Kirsten-Ras)-Mutation ist eine weitere frühe und sehr häufige Mutation im Verlauf der Adenom-Karzinom Sequenz, welche Vogelstein in 40% der Dysplasien größer als 1 cm und in über 60% der kolorektalen Tumoren nachweisen konnte (Vogelstein et al. 1988). Die Mutation bedingt eine konstitutive Aktivierung der Ras-GTPase, welche eine Vielzahl intrazellulärer Signalproteine mit migrationsfördernden, antiapoptotischen und proliferativen Effekten aktiviert (Ross et al. 2001). Zudem kann die Ras-GTPase auch durch aktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren, wie den EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) oder den VEGFR (*Vascular growth factor receptor*) aktiviert werden. Daneben konnte die Mutation im Zuge der RASCAL Multicenterstudie in einer großen Population mit einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit sowie einem erhöhten Rezidivrisiko korreliert werden (Andreyev et al. 1998 und 2001).

Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 wird in über 70% der CRCs aber auch in anderen Neoplasien gefunden und gilt als ursächlich für den Übergang der hochgradigen Dysplasie zum Karzinom, da es eine Schlüsselrolle bei der antimitogenen Kontrolle des Zellzyklus spielt (Köhne et al. 2001).

## **2.2.2 Neue Substanzgruppen in der Therapie des metastasierten Stadiums**

Beruhend auf molekularbiologischen Erkenntnissen über die Regulationsmechanismen des Tumorwachstums wurden auf der Suche nach zielgerichteten Tumorthérapien in den letzten Jahren einige Durchbrüche erzielt. Dabei wurden spezifische Antikörper gegen die Rezeptoren proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) und VEGF (*vascular rowth factor*) entwickelt. Zur therapeutischen Anwendung bei Patienten im metastasierten Stadium erhielten der EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab und der VEGF-Rezeptor-Antikörper Bevacizumab nach klinischer Erprobung im Jahr 2004 in Deutschland die Zulassung. Neuere Studien zeigen eine Verbesserung der Therapieergebnisse durch Kombination von 5FU/FS und dem Topoisomeraseinhibitor Irinotecan mit Cetuximab. So konnte das progressionsfreie Überleben verlängert, die kurative Resektionsrate deutlich verbessert und die Ansprechrate erhöht werden (Van Cutsem et al. 2007). Vergleichbare Studien mit Bevacizimab in Kombination mit 5FU/FS und Oxaliplatin oder Irinotecan zum progressionsfreien Überleben zeigen eine bessere Verträglichkeit mit Irinotecan, obwohl dieses in alleiniger Kombination mit 5FU/FS schlechter vertragen wird (Porschen et al. 2007).



Es konnte sogar ein Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg der neuen Cetuximab-Therapie mit dem Vorliegen einer K-Ras-Mutation gefunden werden. War das Ansprechen auf die Therapie mit Cetuximab bei Vorliegen der Wildtyp-Form gut, so scheint bei Vorliegen einer K-Ras Mutation der Therapieerfolg eher schlecht zu sein (Tabernero 2008).

### 2.2.3 JAK-STAT-Signalweg

Obwohl bereits große Fortschritte bei der Aufklärung molekularer Mechanismen während der Karzinogenese kolorektaler Tumoren gemacht wurden, bleiben viele Fragen offen. Nur 6,6% der untersuchten Kolonkarzinome in einer von Smith 2002 angelegten Kohortenstudie konnten mit der oben beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz in absolute Übereinstimmung gebracht werden (Smith et al. 2002). Dies zeigt, dass es sich hierbei weiterhin um ein sehr komplexes und interessantes Forschungsfeld handelt, da die Entstehungsmechanismen des kolorektalen Karzinoms offenbar sehr heterogen sind und es eine Vielzahl alternativer oder zusätzlicher molekularer Wege gibt, die zur Karzinogenese beitragen (Narayan und Roy 2003). Ein Signalweg, welcher in den letzten Jahren wegen seiner Bedeutung an Beachtung zugenommen hat, ist der sogenannte Jak-Stat-Signalweg, wobei fehlgeleitete Jak-Stat-Transduktionsprozesse bereits in zahlreichen Karzinomen nachgewiesen wurden (Frank 1999); (Bromberg 2001).

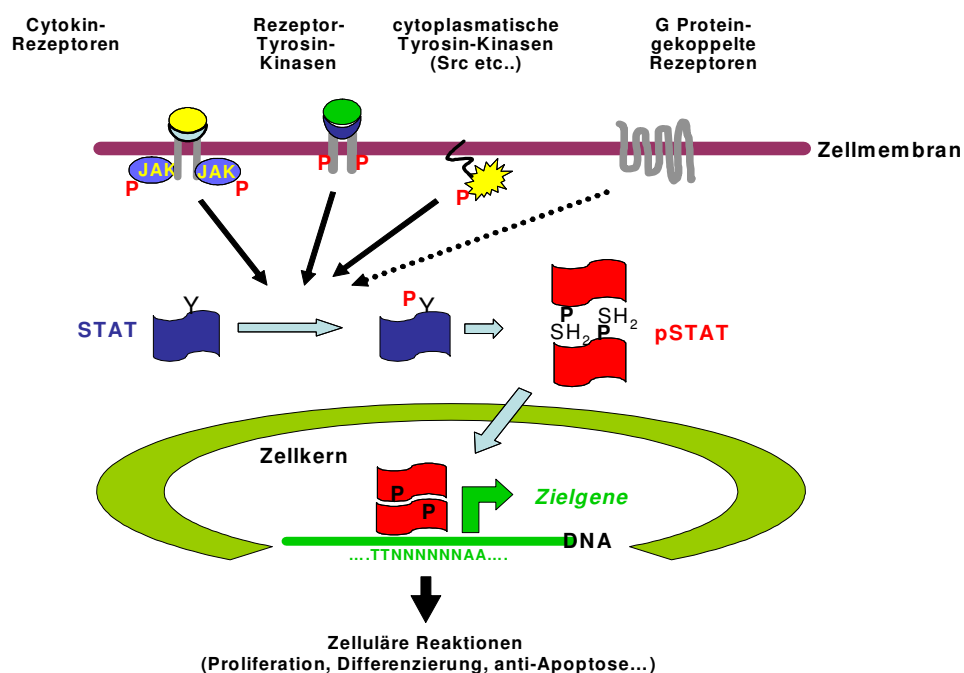
#### Aktivierung

Der JAK-STAT-Signalweg (Abb. 3) stellt eine Art der rezeptorvermittelten Aktivierung intrazellulärer Mediatoren mit Fortleitung des Signals bis in den Zellkern und daraus folgender Transkriptionsaktivierung verschiedener Zielgene dar. Die Bindung bestimmter Liganden (vor allem Zytokine, wie Interferone und Interleukine oder Wachstumsfaktoren, wie EGF, VEGF, HGF [hepatocyte growth factor]) (Silvennoinen et al. 1993) an ihre Rezeptoren führt zur Dimerisierung der beiden Rezeptoreinzelketten und damit zu einer Aktivierung des Rezeptors.

Da viele Zytokinrezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen, führt die Dimerisierung zu einer Aktivierung von rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen aus der Familie der Januskinasen (JAK) (Darnell 1998). Nach Aktivierung können sie sich selbst und intrazelluläre Rezeptordomänen phosphorylieren, was unter anderem an den Bindungsstellen für STAT (*Signal Transducer and Activator of transcription*) geschieht. Diese Bindung erfolgt zwischen der phosphorylierten Stelle des Rezeptors und der SH2 (Src Homology 2)-

Domäne des STAT-Proteins, woraufhin die Tyrosinphosphorylierung und damit Aktivierung der STAT-Proteine, welche normalerweise inaktiv im Zytoplasma vorliegen, durch die JAKs katalysiert wird. Auf diese Weise aktivierte STATs dissoziieren vom Rezeptor und können - über eine reziproke Interaktion der SH2-Domäne des einen STAT-Proteins und dem Phosphotyrosin des anderen STAT-Proteins - sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden (Vinkemeier *et al.*, 1996). Dadurch werden sie in die Lage versetzt, in den Zellkern zu translozieren, dort an Promoterregionen für die Transkription zu binden und spezifische Zielgene zu aktivieren (Gadina *et al.* 2001). Bei der DNA-Bindung kann es zusätzlich zur Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Jun) kommen (Zhang *et al.* 1999). Dies kann unter Bildung großer Komplexe („*enhancesomes*“ = Riesenproteine) zu einer spezifischen Transkriptionskontrolle durch Aktivierung der Transkription von bestimmten Zielgenen (z.B. c-myc, bcl-xL, cyclin D1, bcl-2, VEGF) führen (Bromberg 2001).

Außer einer Aktivierung der STAT-Proteine über Zytokinrezeptoren, wie oben beschrieben, ist auch eine Aktivierung der STATs durch Rezeptortyrosinkinasen wie c-Met und Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. EGFR, VEGFR (Silvennoinen *et al.* 1993) sowie durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie z.B. Src, oder Abl möglich, welche auch als Onkoproteine fungieren können (Bromberg 2001).



**Abb. 3: JAK-STAT Signalweg vereinfacht**

Details siehe Text

## Regulation

Dauer und Intensität der STAT-Aktivierung werden durch verschiedene Prozesse reguliert. So beenden nukleäre Phosphatasen über eine direkte Dephosphorylierung die STAT-Aktivität (Aoki und Matsuda 2002); (ten Hoeve et al. 2002); (Yamamoto et al. 2002), aber auch Ubiquitinylierungs- und Degradierungsprozesse durch Proteasomen (Hoey und Schindler 1998), sowie Inaktivierung von Zytokinrezeptoren oder JAKs durch Tyrosinphosphatasen, wie SHP-1, SHP-2 oder CD45 (Irie-Sasaki et al. 2001) können die STAT-Aktivität modulieren.

STATs können sogar selbst - im Sinne eines negativen Feedbacks - Proteine aktivieren, welche als negative STAT-Regulatoren fungieren. Dies sind zum Beispiel CIS-1 (*Cytokine Inducible SH2-domain Containing Protein*) oder SOCS1, 2 und 3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) (Terabe et al. 2000, Yasukawa et al. 2000), die indirekt durch Blockade der Zytokinrezeptor-Phosphorylierung, Inhibition der JAKs oder Förderung von deren Ubiquitinylierung in der Lage sind, die STAT-Aktivität zu unterbrechen.

Eine direkte und spezifische Inhibition der STAT-DNA-Interaktion kann durch PIAS (*Protein Inhibitor of Activated Stat*) erfolgen (Chung et al. 1997). Außerdem besteht noch die Möglichkeit der Inhibition und Modulation durch natürliche Splicevarianten der STATs (Ward et al. 2000), sowie Modulation der Transkriptionsaktivität durch zusätzliche Serinphosphorylierung (Wen et al. 1995, Jain et al. 1998).

## Funktionen

Bis jetzt werden vier JAKs (Tyk2, JAK1, JAK2 und JAK3), sowie sieben STATs (STAT1-4, STAT5a und b sowie STAT6) unterschieden, wobei durch alternatives Splicing der mRNA zusätzliche Varianten von einzelnen STATs vor allem von STAT 1, 3 und 5 entstehen können. Eine gleichzeitige persistierende Aktivität von STAT1, STAT3 und STAT5 wurde interessanterweise in Tumoren von unterschiedlichster Genese (z.B. in Kolonkarzinomen) gehäuft beobachtet (Corvinus et al. 2005).

Die wichtigsten der vielseitigen STAT-Funktionen zeigten sich durch Depletion ihrer Gene in *Knockout*-Mäusen. So ist STAT1 ein Tumorsuppressor, der zu anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekten führt, aber auch an der Kontrolle der Antigenpräsentation und immunogenen Aktivität von Tumoren beteiligt ist. STAT2, 4, 5 und 6 spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem, dabei ist STAT2 an der viralen Abwehr, STAT4 an der Abwehr intrazellulärer Erreger, STAT5 an der Entwicklung von Leukozyten und STAT6 bei der erworbenen Immunität, beim Klassenwechsel der B-Lymphozyten und der IgE Produktion

essentiell. STAT4 scheint aber auch an der Autoantikörperproduktion und der Glomerulonephritis beim Lupus Erythematoses beteiligt zu sein. Im Gegensatz zu STAT1 wurde aktiviertes STAT5 in vielen bösartigen Tumoren gefunden, da es wie auch STAT3 eine wichtige Rolle bei der Apoptose, der Zellzyklusprogression und der Zellproliferation spielt (Paukku und Silvennoinen 2004).

Wegen seiner herausragenden Bedeutung in der Tumorbilogie soll in dieser Arbeit STAT3 im Kolorektalkarzinom besonderes Augenmerk gelten.

## **2.2.4 STAT3 - ein Transkriptionsfaktor mit onkogenen Eigenschaften**

STAT3 wurde 1994 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen als *Acute Phase Response Factor* (APRF) beschrieben, der in Leberzellen die Transkription der Akuten-Phase-Proteine einleitet (Lütticken *et al.*, 1994; Akira *et al.*, 1994). Unabhängig davon klonierten Zhong *et al.* diesen Transkriptionsfaktor (Zhong *et al.* 1994), welcher ubiquitär in allen Geweben auftritt (Duncan *et al.* 1997) und gaben ihm den Namen STAT3.

Die wichtigsten Funktionen der STATs offenbarten sich nach Depletion ihrer Gene in *Knockout*-Mäusen, wobei STAT3 das einzige Protein der STAT-Familie ist, dessen *Knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind. Daran zeigte sich, dass STAT3 essentielle Funktionen in frühen Entwicklungsphasen der Embryogenese innewohnen. So konnte zum einen gezeigt werden, dass ein STAT3-*Knockout* in embryonalen Mausanlagen bereits vor der Gastrulation zu einem Absterben und zu einem vollständigen Unterbleiben der Bildung von viszeralem Endoderm führt (Darnell 1997). Zum anderen sind ausgereifte STAT3-defiziente Zellen, wie Darmepithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten lebensfähig und weisen nur wenige Defekte auf.

Auch in humanen Trophoblasten konnte aktiviertes STAT3 gefunden werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass STAT3 während der Entwicklung und für die Funktion der Plazenta eine Rolle spielt (Corvinus *et al.* 2003).

STAT3 wird nicht nur eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben (Levy und Lee 2002), sondern scheint ebenfalls wesentliche wachstums- und zelldifferenzierungsfördernde Eigenschaften in Tumorzellen zu besitzen (Bromberg 2001). Dass STAT3 einen Einfluss auf den Zellzyklus besitzt, konnte unter Zellkulturbedingungen gezeigt werden. So erhöht STAT3 über Liganden des gp130-Rezeptors die Expression von Cyclin D2, D3, A und cdc25A und supprimiert p21 und p27, was zur Progression des Zellzyklus von der G zur S-Phase führt (Fukada *et al.* 1996).

Dieser Einfluss ist jedoch abhängig vom Gewebetyp und Entwicklungsstadium. Dabei führt STAT3 in der Brustdrüse, wo es normalerweise die Apoptose aktiviert, nach Depletion zu einer Verzögerung der Involution (Chapman et al. 1999). Eine Kontrollfunktion bei der Zellmigration konnte STAT3 bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Zebrafischmodell, sowie in Keratinozyten zugeschrieben werden (Sano et al. 1999, Yamashita et al. 2002) und in der IL-6-induzierten Akute-Phase-Reaktion ist STAT3 der bestimmende Transkriptionsfaktor bei der Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Alonzi et al. 2001, Heinrich et al. 1998). STAT3 scheint somit auf gegenteilige Art und Weise das Zellwachstum zu beeinflussen und gewebeabhängig seine Funktionen auszuüben (Levy und Lee 2002).

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass im kolorektalen Karzinom STAT3 das STAT-Protein mit der höchsten Inzidenz konstitutiver Aktivität war. Erstaunlicherweise verloren die sechs untersuchten, aus kolorektalen Karzinomen abgeleiteten Zelllinien durch Kultivierung ihre konstitutive STAT3-Aktivität. Durch Zugabe von IL-6 konnte STAT3 jedoch aktiviert werden und durch Einbringen der Zellen in Nacktmäuse kehrte die konstitutive STAT3-Aktivität in den zwei darauf untersuchten Zelllinien sogar zurück. Außerdem konnte dargelegt werden, dass die STAT3-Aktivität in kolorektalen Karzinomen zu einer gesteigerten Proliferation und eine Suppression der STAT3-Aktivität zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt (Corvinus et al. 2005). STAT3 spielt zudem durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine wichtige Rolle bei der Invasivität kolorektaler Karzinome (Tsareva et al. 2007).

Veränderte STAT3-Aktivität wird mittlerweile als funktionell wichtig für die Entstehung und das Überleben von verschiedenen malignen Tumoren betrachtet (Burke et al. 2001). Da von STAT3 Gene reguliert werden, die sowohl in der Wundheilung wie auch in der Tumorigenese von Bedeutung sind, gibt es Hypothesen, die einen Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung auf molekularer Ebene und einer gestörten Wundheilung postulieren (Dauer et al. 2005). Wenig verstanden ist aber immer noch, über welche Mechanismen die exzessive STAT3-Aktivität in den Tumoren entsteht.

### 2.2.5 STAT3-Inhibitoren

Aufgrund seiner Überexprimierung in zahlreichen Tumoren ist STAT3 ein attraktives Molekül als potenzieller Angriffspunkt in der Krebstherapie (Turkson und Jove 2000, Inghirami et al. 2005). Dies ist einer der Gründe, weshalb die Suche nach möglichen STAT3-Inhibitoren Gegenstand intensiver Bemühungen ist. Außerdem gibt es bisher nur wenige spezifische und selektive STAT3-Inhibitoren.

In diesem Zusammenhang war die Entdeckung natürlicher Verbindungen interessant, zum Beispiel aus Obst, Gemüse oder Gewürzen, die wichtige biologische Funktionen wie beispielsweise neuroprotektive und antioxidantische, aber auch anti-kanzerogene Wirkungen zeigen. Hierzu gehören unter anderem Cucurbitacin-Derivate - welche man aus einigen Kürbissen oder Zucchini isolieren kann - und einige andere mehr. Diese können in einigen Tumorzellen zu einer indirekten Inhibierung der STAT3-Aktivität über eine Phosphorylierungshemmung der IL-6-induzierten Januskinasen oder der Src-Kinasen führen. Dadurch kann es in diesen Tumoren zur Wachstumsinhibition, Apoptose oder einer Blockade der Angiogenese kommen, da durch diese Inhibition auch die Transkription STAT3-abhängiger Gene wie Cyclin D1, Bcl-xl oder VEGF blockiert werden kann. Im Mausmodell hat es auch schon zu einer Lebensverlängerung der Versuchstiere oder zu einem verbessernden Effekt der Krebsimmuntherapie geführt (Blaskovich et al. 2003, Nefedova et al. 2005).

Auch synthetische Verbindungen wie Tyrphostine (z.B. JAK-Inhibitor AG 490) (Nielsen et al. 1997, Eriksen et al. 2001), Platinkomplexe (z.B. Cisplatin) (Song et al. 2004) und das Immunsuppressivum Atiprimod inhibieren die STAT3-Aktivität (Amit-Vazina et al. 2005), jedoch ebenfalls indirekt durch eine Hemmung des JAK/STAT-Signalwegs. Durch die indirekte Hemmung über eine Blockade vorgeschalteter Signalwege ist die STAT3-Inhibition nicht spezifisch und selektiv, sondern es kann auch zu einigen Nebeneffekten über mitinhibierte andere Signalmediatoren kommen (Deng et al. 2007).

Ein STAT3-Inhibitor, der auch in der klinischen Anwendung Bestand haben soll, hat gewisse Anforderungen zu erfüllen. So ist es wichtig, dass keine vorgeschalteten Signalmediatoren oder andere STAT-Proteine, sondern allein die Dimerisierung, die Kerntranslokation und die Transkriptionseinleitung von STAT3 blockiert werden, um den Tumor gezielt zu bekämpfen und mögliche Nebenwirkungen zu minimieren (Deng et al. 2007).

Peptidomimetika wie Tripeptid-Derivate ahmen Peptidstrukturen von Rezeptorelementen, von Negativregulatoren der STAT3-Aktivität (z.B. SOCS-1) (Flowers et al. 2005) oder der

STAT3-Bindungsstellen (Coleman et al. 2005) nach und können dadurch direkt die STAT3-Dimerisierung, Kerntranslokation und DNA-Bindung (Turkson et al. 2001) blockieren.

In dieser Arbeit zur Anwendung gekommen ist ein Peptidomimetikum namens OMT, eine Verbindung aus den beiden phospho-Tyrosinmimetika L-Tmp (L-4-((tetrazol-5-yl)methyl)phenylalanin) und L-OMT (l-O-malonyltyrosin). OMT ahmt phosphoryliertes Tyrosin nach, bindet so hochaffin an die SH2 Domäne des STAT3 und blockiert dadurch direkt die Dimerisierung (Dourlat et al. 2007).

## **2.2.6 Funktionen von Komponenten des JAK/STAT Signalweges und seines Umfeldes in der Onkogenese**

Der JAK/STAT Signalweg spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen einschließlich Zellwachstum und Differenzierung, Hämatopoese und der Beeinflussung des Immunsystems (Rane und Reddy 2000).

Im Laufe intensiver Forschungen haben sich die Hinweise gehäuft, dass der JAK/STAT-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Tumorigenese spielt. So wurde beispielsweise konstitutive JAK2-Aktivität bei der kindlichen Form der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie gefunden (Lacronique et al. 1997). Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen phospho-JAK2-Immunreaktivität und der Differenzierung kolorektaler Adenokarzinome festgestellt (Lassmann et al. 2007). Im T-Zell-Lymphom scheint die Aktivität der Januskinasen essenziell für die Invasivität und Metastasierung des Lymphoms zu sein (Opdam et al. 2004).

Die genauen Funktionen der JAKs im kolorektalen Karzinom sind jedoch immer noch nicht ganz klar.

Die Protein-Tyrosinkinase v-Src ist das Umwandlungsprodukt des *Rous sarcoma yirus*, welches das zuerst identifizierte onkogene Retrovirus ist (Brugge und Erikson 1977). Src ist der zelluläre Gegenpart von v-Src, und Mitglied einer Familie von membranassoziierten nicht rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen, die aktiviert ebenfalls in der Lage sind STAT3 zu phosphorylieren. Diese Familie umfasst neun Mitglieder, von denen einige (Src, Fyn und Yes) ubiquitär vorkommen und einige, deren Expression eingeschränkter ist (Thomas und Brugge 1997).

Src ist eines der zuerst entdeckten und meist untersuchten Onkogene, welches im Zusammenhang mit der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms (Summy und Gallick 2003) und geringer klinischer Prognose (Aligayer et al. 2002) steht. Die Überexpression und

Überaktivierung von Src, die vermeintlich nicht assoziiert sind mit Mutationen im src-Gen, scheinen im kolorektalen Karzinom vorherrschend zu sein, obwohl über gelegentliche Mutationen berichtet wurde (Irby et al. 1999, Ishizawa und Parsons 2004). Zusätzlich zu Src sind andere Mitglieder der Src-Familie wie Yes und Lck ebenfalls in einigen kolorektalen Karzinomen aktiviert oder verändert exprimiert (Veillette et al. 1987, Park et al. 1993).

Eindeutige Beweise belegen, dass erhöhte Src-Expression und/oder Aktivität mit der Entstehung epithelialer Karzinome wie Brust- oder Darmkrebs assoziiert ist (Summy und Gallick 2003).

Die Inhibition von Src oder JAKs in Brustkrebszellen resultiert in einer dosisabhängigen Reduzierung der STAT3-DNA-Bindungsaktivität, die begleitet wird von Wachstums-Inhibition und Induktion des programmierten Zelltod (Garcia et al. 2001). Demgegenüber scheint STAT3 essenziell für die Transformation von v-Src zu sein (Bromberg et al. 1998).

Src-Aktivität in Krebszellen kann Resistenz gegen Anoikis (durch Ablösung induzierter Zelltod) über Signalwege induzieren, welche mit einer Aktivierung eines antiapoptotischen Proteins der Bcl-2-Familie enden, was schließlich zu einem Fortschreiten der Erkrankung führt (Windham et al. 2002, Coll et al. 2002). Durch Untersuchungen an einer Vielzahl von CRC-Zelllinien wurde festgestellt, dass alle untersuchten Zelllinien in ihrem Wachstum und auch der Grad der tyrosinphosphorylierten Proteine von der Aktivität der Src-Kinasen abhängig sind (Emaduddin et al. 2008).



### **3. Ziele der Arbeit**

Analyse der Expression sowie der Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in Gewebe kolorektaler Tumoren und dem nicht neoplastisch veränderten Randgewebe von 34 Patienten sowie in 64 Kolorektalkarzinom-abgeleiteten Zelllinien.

Bestimmung der globalen Tyrosinphosphorylierung in Biopsien aus dem Tumor und nicht entartetem Randgewebe sowie in CRC-Zelllinien.

Evaluierung potentieller STAT3-Aktivatoren in Biopsiematerial und CRC-Zelllinien durch Bestimmung von Expression und Aktivierung und Beurteilung anhand Korrelations- oder Abhängigkeitsanalysen.

Korrelation pathologisch morphologischer Daten der Tumorgewebe mit biochemischen Ergebnissen zur STAT3-, SRC-, JAK1- und JAK2-Expression und –Aktivierung.

Beurteilung des Einflusses der JAK-, Src- und STAT3-Aktivität auf das Wachstum und das Überleben des kolorektalen Karzinoms anhand einer ausgewählten CRC-Zelllinie in Proliferations- und Zytotoxizitätsassays nach selektiver Inhibition.

## 4. Materialien und Methodik

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Verwendete Zellen und Medien

Selbstkultivierte Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Benötigtes Medium	Bezugsquelle
C-10 (Browning et al. 1993)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- abgeleitet aus kolorektalem Karzinom</li> <li>- adhärent wachsend</li> <li>- aktiviert c-Met über die Src-Kinase</li> <li>- sowohl STAT3, als auch Src und JAK2 sind konstitutiv aktiv</li> </ul>	DMEM 88% + 10% FKS + 1% Gentamycin + 1% L-Glutamin	Stephan M. Feller (University of Oxford)

Zur Verfügung standen CRC-Zelllinienlysate in definierter Proteinkonzentration (1 µg/µl) SDS-Probenpuffer, die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Stephan Feller (University of Oxford) bezogen wurden.

Die Vorbereitung der Proben durch den Kooperationspartner geschah wie folgt:

Die CRC-Zelllinien wurden in DMEM ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, Antibiotika und 10% FKS bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor der Zelllyse wurden die Zellen - ab dem letzten Mediumwechsel - für 48 Stunden kultiviert und anschließend dreimal mit gekühltem PBS gewaschen

Die Zelllyse erfolgte mit RIPA-Puffer [20 mM Tris\_HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Desoxycholsäure, und 0.1% SDS] und zugefügten 2-fachen kompletten Proteaseinhibitor-Mix (11697498001; Roche Diagnostics), sowie den Phosphataseinhibitorcocktails 1 und 2 (P2850 and P5726; Sigma-Aldrich) bei 4°C unter schwenken. Anschließend wurden die Lysate für 30 Minuten bei 22.000 rpm zentrifugiert und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford Methode bestimmt.

No.		
1.	C10	(Browning et al. 1993)
2.	C32	(Browning et al. 1993)
3.	C70	(Browning et al. 1993)
4.	C75	(Browning et al. 1993)
5.	C80	(Browning et al. 1993)
6.	C84	(Browning et al. 1993)
7.	C99	(Wheeler et al. 1999)
8.	C106	(Wheeler et al. 1999)
9.	C125-PM	(Liu und Bodmer 2006)
10.	Caco-2	ATCC, USA (www.atcc.org)
11.	CaR-1	Health Science Research Resource Bank (HSRRB), Japan (www.jhsf.or.jp)
12.	CC20	(Greenhalgh und Kinsella 1985)
13.	CCK-81	HSRRB
14.	CC07	(Browning et al. 1993)
15.	CoCM-1	HSRRB
16.	COLO 320DM	ATCC
17.	COLO-678	DSMZ, Germany (www.dsmz.de)
18.	COLO 741	ECACC, UK (www.ecacc.org.uk)
19.	DLD-1	ATCC
20.	GP2d	(Solic et al. 1995)
21.	HCA-7	(Kirkland 1985)
22.	HCA-46	(Kirkland und Bailey 1986)
23.	HCT 116	ATCC
24.	HDC-8	(Bruderlein et al. 1990)
25.	HDC-9	(Bruderlein et al. 1990)
26.	HDC-54	(Bruderlein et al. 1990)
27.	HDC-57	(Bruderlein et al. 1990)
28.	HDC-73	(Bruderlein et al. 1990)
29.	HDC-82	(Bruderlein et al. 1990)
30.	HDC-111	(Bruderlein et al. 1990)
31.	HDC-114	(Bruderlein et al. 1990)
32.	HDC-135	(Bruderlein et al. 1990)
33.	HDC-142	(Bruderlein et al. 1990)
34.	HDC-143	(Bruderlein et al. 1990)
35.	HRA-19	(Kirkland 1986)
36.	HT-29	ATCC
37.	HT55	(Watkins und Sanger 1977)
38.	LIM1863	(Whitehead et al. 1987)
39.	LoVo	ATCC
40.	LS123	ATCC
41.	LS 174T	ATCC
42.	LS 180	ATCC
43.	LS411	ATCC
44.	LS513	ATCC
45.	LS1034	ATCC
46.	NCI-H548	ATCC
47.	NCI-H716	ATCC
48.	NCI-H747	ATCC
49.	OXCO-1	Vincenzo Cerundolo and Khoon Lin Ling, WIMM, Oxford, UK (Unpublished)
50.	OXCO-3	Vincenzo Cerundolo and Khoon Lin Ling, WIMM, Oxford, UK (Unpublished)
51.	PC/JW	(Berry und Paraskeva 1988)
52.	RCM-1	HSRRB
53.	RKO	ATCC
54.	SK-CO-1	ATCC
55.	SNU-C2B	ATCC
56.	SW48	ATCC
57.	SW403	ATCC
58.	SW620	ATCC
59.	SW837	ATCC
60.	SW948	ATCC
61.	SW1116	ATCC
62.	SW1417	ATCC
63.	T84	ATCC
64.	VACO 4A	(McBain et al. 1984)

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete CRC Zelllinie**

### 4.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Verwendete Verdünnung	Epitop, Zielmolekül	Spezies	Bezugsquelle
Anti- Src	1:1000 (WB)	Src	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-Src Familie (Tyr416)	1:1000 (WB)	Phospho-Src Familie (Tyr416)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti- JAK2 (24B11)	1:1000 (WB)	Jak2 (24B11)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
anti-STAT3 (H-190)	1:1000 (WB)	STAT3 (H-190)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
anti-phospho-STAT3 (Tyr705)	1:1000 (WB)	Phospho-STAT3 (Tyr 705)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-Tyrosin (P-Tyr-100)	1:1000 (WB)	P-Tyr -100	Maus, mAb	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-JAK1 (Tyr1022/1023)	1:1000 (WB)	Phospho Jak1 (Tyr1022/1023)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-JAK1 (6G4)	1:1000 (WB)	Jak1 (6G4)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti-c-Jun (60A8)	1:1000(WB)	c-Jun (60A8)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
anti-Kaninchen-IgG-HRP	1: 10000 (WB)	Kaninchen IgG	Kaninchen IgG HRP-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology
Anti-phospho-JAK2 (Tyr1007/1008)	1:1000(WB)	Phospho Jak2 (Tyr1007/1008)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
Anti- $\beta$ -Actin	1:1000(WB)	$\beta$ -Actin	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology

### 4.1.3 Inhibitoren

Bezeichnung	Wirkung	Bezugsquelle	Referenzen
STAT3-Inhibitorpeptid (OMT)	Hemmt die STAT3 Dimerisierung durch Bindung an die SH <sub>2</sub> -Domäne	J. Dourlat, Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire	(Dourlat et al. 2007)
STAT3-Kontrollpeptid	Negativkontrolle für OMT. Struktur wie OMT, aber ohne SH <sub>2</sub> -Bindungsstelle	J. Dourlat Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Cellulaire	(Dourlat et al. 2007)
Src-Inhibitor (PP2)	Hemmt die Src-Phosphorylierung	Calbiochem	(Emaduddin et al. 2008)
Src-Kontrolle (PP3)	Negativkontrolle für PP2	Calbiochem	(Emaduddin et al. 2008)
JAK-Inhibitor (P6)	Hemmt die JAK-Phosphorylierung	Calbiochem	(Emaduddin et al. 2008)
Met-Kinase-Inhibitor (SU 11274)	Hemmt die Met-Phosphorylierung	Calbiochem	(Emaduddin et al. 2008)

### 4.1.4 Chemikalien / Feinchemikalien / Kits

Acrylamid, Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH & Co.
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ECL-Kit	Perkin Elmer Life Sciences
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.
FKS	PAA Laboratories GmbH
Gentamycin	Gibco BRL
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.
NaCl	Carl Roth GmbH & Co.
NP-40	Serva Electrophoresis GmbH
Proteaseinhibitor complete Mini	Roche Diagnostics GmbH
PhosStop	Roche Diagnostics GmbH
Roti-Quant®	Carl Roth GmbH & Co.

SDS	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH
Tris	Carl Roth GmbH & Co.
Trypanblau	Merck KGaA
Trypsin-EDTA (1 x)	Biochrom AG
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co.

#### **4.1.5 Puffer und Lösungen**

##### Blockingpuffer Western Blot (100 ml)

100 ml 1 x TBS-T, 5 g Magermilchpulver

##### Elektrophoresepuffer (10x)

144 g Glycin, 30 g Tris, 10 g SDS, auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.

Bei Gebrauch 1:10 verdünnen in Aqua dest.

##### Lysepuffer NP-40:

400 µl NP-40, 75 µl Proteaseinhibitormix, 25 µl Phosphataseinhibitormix

##### PBS

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,2 einstellen, auf 1 l auffüllen mit Aqua dest., autoklavieren

##### Ponceau-Färbelösung

2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure (TCA), 30 g Sulfosalicylsäure

auf 100 ml auffüllen mit Aqua dest.

##### Probenpuffer für SDS-Gele (5x)

25 mg Bromphenolblau, 500 mg SDS, 2 ml H<sub>2</sub>O, 1,5 ml Tris (1M pH 6,8), 1,5 ml Glycerol, 0,55 ml Mercaptoethanol

##### Strippuffer

62,5 mM Tris/HCl, 2% SDS, 10 mM 2-β-Mercaptoethanol, pH 6,7

NET-G (10x)

43,8 g NaCl, 9,3 g EDTA, 30,3 g TrisHCl (pH 7,5), 2,5 ml TritonX-100, 1 g Gelatine

NaCl, EDTA, TrisHCl in ca. 300 ml einwiegen, pH 7,5 mit HCl einstellen,

Gelatine in ca. 100 ml H<sub>2</sub>O einwiegen, durch Erhitzen lösen, zugeben,

Triton X-100 zupipettieren, auf 500 ml Aqua dest. auffüllen

TBS-(T) (10x)

90 g NaCl, 157,6 g Tris

auf 1 l auffüllen mit Aqua dest., pH 7,5 einstellen mit konz. HCl (ca. 50 ml)

0,1% Tween 20 vor Gebrauch dem 1x-Puffer zugeben

Transferpuffer WesternBlot

3,03 g Tris, 14,41 g Glycin, 200 ml Methanol

pH 7,5 einstellen mit HCl, auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.

**4.1.6 Verwendete Geräte, Materialien und Programme**

Photometer Spekol 1200 (Analytik Jena, AG)

96-Well-Plattenreader Sunrise (TECAN)

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135M (Carl Zeiss Jena)

Kulturgefäße: 250 ml Kulturflaschen (Greiner)

6-, 96-Lochplatten (Greiner)

Kryoröhrchen (Greiner)

Plastikröhrchen, steril: 15ml, 50 ml (Greiner)

AIDA Image Analyzer v3.11.

Excel (Microsoft Windows)

SPSS (Microsoft Windows)

#### 4.1.7 Verwendetes Biopsiematerial

Die bereits pulverisierten Gewebeproben stellte Alexander B. Pupyshev von der russischen Akademie der Wissenschaften in Novosibirsk (RU) zur Verfügung.

Die Probengewinnung erfolgte indem während der Tumorresektion Gewebeproben aus dem Tumorzentrum sowie dem angrenzenden nicht-neoplastisch veränderten Gewebe entnommen und zügig kryokonserviert und homogenisiert wurden.

No.	Novosibirsk-code	TMN-Klassifikation	Malignitäts-grad	Lokalisation	Zeit nach Diagnose
1	4	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G3	Rectum	3 Monate
2	6	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G3	Sigma	5 M.
3	9	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>+</sub>	G4	Sigma	3 M.
4	10	T <sub>1</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G1	Rectum	3 M.
5	11	T <sub>3</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G2	Colon	7 M.
6	13	T <sub>2</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G2	Colon	6 M.
7	14	T <sub>2</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G1	Rectum	5 M.
8	15	T <sub>3</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>x</sub> , in der Leber	G4	Rectum	4 M.
9	16	T <sub>3</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G2	Colon	3 M.
10	19	T <sub>2</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G2	Colon	3 M.
11	20	T <sub>4</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>x</sub> in der Leber	G4	Colon	4 M.
12	21	T <sub>3</sub> ,N <sub>0</sub> ,M <sub>0</sub>	G2	Colon	3 M.
13	24	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Colon	3 M.
14	26	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Rectum	4 M.
15	27	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>+</sub> in der Leber	G4	Colon	10 M.
16	29	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G2	Sigma	
17	30			Colon	4 M.
18	31	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G2	Rectum	3 M.
19	32	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Colon	6 M.
20	35	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Rectum	6 M.
21	36	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G2	Rectum	9 M.
22	37	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Sigma	3 M.
23	38	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Colon	1 M..
24	39	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Colon	2 Jahre
25	43	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G2	Rectum	3 M.
26	44	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Sigma	2 M.
27	46	T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G2	Sigma	3 M..
28	47	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>+</sub> in der Leber	G4	Rectum	9 M.
29	48	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>+</sub>	G4	Sigma	12 M.
30	50	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>+</sub> in der Leber	G4	Colon	6 M.
31	51	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	G3	Sigma	3 Jahre
32	52	T <sub>3</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	G3	Colon	14 M.
33	53	T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>+</sub> in der Leber	G4	Rectum	10 M..
34	54	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	G1	Rectum	4 M.

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete CRC Biopsien**



## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **4.2.1.1 Kultivierung und Passagierung von Zellen**

Die verwendeten Zellen werden in Zellkulturflaschen (Kulturflasche 75 cm<sup>2</sup> [Greiner]) im Kompletmedium (siehe Tabelle 1) steril kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgt in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank für Zell- und Gewebekulturen (HERAcell 240, HERAEUS) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% relativer Luftfeuchte.

Die C10-Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Bei einer Zelldichte von ca.  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen /ml werden sie durch Zugabe von 4 ml Trypsin/EDTA (Biochrom AG) und fünfminütiger Inkubation im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wird in gleicher Menge Kulturmedium hinzu gegeben. Um Zellen vom Medium zu trennen, werden sie bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert, anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach können sie in frischem oder verändertem Medium aufgenommen und auf die gewünschte Zelldichte verdünnt werden.

#### **4.2.1.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen**

Im Stickstoff konservierte Kulturen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in entsprechendes Medium gegeben und schnellstmöglich durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 4 min vom Einfriermedium getrennt. Nach mehreren Waschgängen mit ihrem Medium konnten die Zellen in Kulturflaschen (Greiner) aufgenommen werden.

Um Kulturen einzufrieren und auf Dauer zu konservieren, werden ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen /ml in Einfriermedium (6% DMSO + 94% FKS) aufgenommen. Die Suspension wird zu je 1 ml auf sterile Kryoröhrchen (Greiner) verteilt und bei -80°C eingefroren. Nach 3-14 Tagen werden die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank (-192°C) überführt.

#### **4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl einer Kultur**

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt nach Vitalfärbung mit Tryptophanblau (4%) durch Auszählen in einer Zählkammer (Neubauer).

#### **4.2.1.4 Inhibition von Zellen**

Zur Inhibition der C-10-Zellen werden diese zunächst abgelöst (siehe 4.2.1.1) und in 6- Well-Platten überführt. Pro Well werden hierfür  $4,5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml DMEM-Medium ausgesät und 24 h unter Normalbedingungen kultiviert, um ein ausreichendes Anwachsen der Zellen zu garantieren. Im Anschluss wird das DMEM-Medium abgesaugt und der gewünschte Inhibitor in der gewählten Konzentration in frischem DMEM-Medium gelöst und zu den Zellen hinzugegeben.

#### **4.2.1.5 Proliferationsassay**

Die Proliferationstests mit den C-10-Zellen erfolgen in einer 96-Well-Platte mit einer colorimetrischen Methode. ("CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay", Promega).

Pro Well werden 2.500 oder 6.000 Zellen in 82  $\mu$ l DMEM-Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Zugabe von unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen, so dass schließlich 100  $\mu$ l DMEM mit unterschiedlichen JAK Inhibitor I-Konzentrationen (0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25  $\mu$ M Inhibitor/Medium) in Doppelbestimmung eingesetzt werden. Diese Platte inkubiert für 72 h unter Standardbedingungen. Danach erfolgt die Zugabe von 20  $\mu$ l MTS pro Well. Das MTS–Tetrazolium–Reagenz wird von metabolisch aktiven Zellen zu einem im Medium löslichen Formazan–Produkt reduziert [nach Berridge und Tan, 1992]. Die Absorption des Formazanderivats kann im Mikroplattenreader bei 490 nm gemessen und als Maß für die Proliferation der Zellen verwendet werden.

#### **4.2.1.6 LDH-Test**

Der LDH-Test mit den C-10 Zellen erfolgt in einer 96-Well-Platte.

Pro Well werden 3000 Zellen in 82  $\mu$ l DMEM-Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Zugabe von 20  $\mu$ l STAT3-Inhibitorpeptid-DMEM Lösung zu den mittlerweile verbleibenden 80  $\mu$ l (etwa 2  $\mu$ l verdampfen über Nacht) in unterschiedlichen Konzentrationen (0; 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100  $\mu$ M) in Doppelbestimmung. Außerdem werden als Negativkontrolle die gleichen Konzentrationen des Kontrollpeptids, sowie die gleichen Mengen DMSO jeweils in Doppelbestimmung eingesetzt, um Effekte die auf das Lösungsmittel (DMSO) oder die

Peptidstruktur zurückzuführen sind zu eruieren. Nach einer halben Stunde erfolgt die Messung der Absorbanz in einem Mikroplattenreader bei 490 nm.

## **4.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **4.2.2.1 Zelllyse**

Die Zelllyse dient der Extraktion der Zellproteine. Für die Lyse findet der NP-40 Lysepuffer Anwendung. Um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern und nicht den aktuellen Phosphorylierungsstatus durch Dephosphorylierung zu verändern, werden dem Lysepuffer Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugefügt.

Die Zellpellets werden mit 10-15 µl (je nach Größe des Pellets) und das Tumorpulver mit 20-40 µl (je nach Pulvermenge) des Lysepuffers versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um im Kern enthaltende Proteine zu gewinnen, werden die Zellkerne durch abwechselndes Bad in flüssigem Stickstoff und 37 °C warmem Wasserbad zerstört. Anschließend werden die Zellfragmente bei 14.000 rpm und 4 °C für 20 min abzentrifugiert, der Überstand wird für Bradfordbestimmung und SDS-PAGE weiterverwendet.

### **4.2.2.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford**

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Zunächst nimmt man eine Eichkurve mit verschiedenen Verdünnungen einer Rinderserumalbumin (BSA)–Stammlösung auf. Dazu werden 1 ml Bradford–Reagenz (Roti®-Quant, Roth GmbH & Co KG) 1:5 in Aqua dest. verdünnt und 1 ml davon in einer Einwegküvette vorgelegt. Jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe bzw. der jeweiligen Verdünnung des Standards werden hinzu pipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 595 nm an dem Gerät Spekol 1200 (Analytik AG, Jena). Mit Hilfe der erhaltenen Extinktionswerte der einzelnen Standardkonzentrationen kann so eine Regressionsgerade ermittelt werden, anhand derer der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt wird.

### **4.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE, bei der Natriumdodecylsulfat als Detergenz eingesetzt wird, um die Proteine zu denaturieren und negativ zu laden, erfolgt nach der Standardmethode (Lämmli, 1970). Es

werden 8,4%ige Polyacrylamid-Gele (Herstellung Tabelle 3) verwendet, zur Auftrennung von sehr kleinen Proteinen wird die Konzentration von Acrylamid auf 12,5% erhöht. Die polymerisierten Gele werden in die Apparaturen von BioRad eingespannt, die Kammern mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt und die Geltaschen mit einer Proteinmenge von 20 µg beladen. Zuvor versetzt man die Probe mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer und denaturiert die Proteine bei 95°C für 5 min. Die Auftrennung der Proteine erfolgt für 20 min bei 100 V, 250 mA (Sammelgel) und für 60-90 min bei 180 V, 500 mA (Trenngel). Als Proteingrößenstandard wurde der SDS-7B2-Marker (Sigma) verwendet.

Trenngelpuffer: TRIS-HCl 2 M, pH 8,0

Sammelgelpuffer: TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Wasser	3,3 ml	2,0 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,0 ml	1,3 ml
Acrylamid (40%)	2,2 ml	700 µl
Glycerin (40%)	4,0 ml	1,0 ml
SDS (20%)	50 µl	25 µl
APS (10%)	50 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl

**Tabelle 3: Vorschrift für 8,4%iges Polyacrylamidgel**

#### 4.2.2.4 Western Blot

Die zu detektierenden Proteine werden im vorangegangenen Schritt im Gel der Größe nach aufgetrennt und müssen nun auf eine Nitrocellulosemembran überführt werden, um sie mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Zum Transfer wird eine Blotapparatur von Biorad benutzt, die mit 1x Transferpuffer gefüllt wird. Der Blotvorgang dauert bei 100 V und 300 mA je nach Größe der Zielproteine 60-90 min.

Nach dem Blotten wird die Membran 15 min in 1x Ponceau-S geschwenkt. Durch die auftretende Färbung kann optisch kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war und überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

#### **4.2.2.5 Immunodetektion**

Nach dem Blotten wird die Membran mit Blockpuffer für 60 min blockiert und danach 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit in 1x TBS-T+ 5% BSA+  $\text{NaN}_3$  verdünntem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Nachdem die Antikörperlösung entfernt wurde, erfolgt durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBS-T für je 5 min die Entfernung von nicht gebundenen primären Antikörpern. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem in 1x TBS-T+ 5% BSA gelösten, Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Durch mehrmaliges Waschen (3x mit 1x TBS-T je 5 min) sollte auch hier nicht gebundener sekundärer Antikörper von der Membran entfernt werden. Alternativ kann die Membran in einem Schritt mit NET-G gewaschen und blockiert werden. Dann erfolgt auch die Lösung des primären und sekundären Antikörpers in NET-G. Die Waschvorgänge dauern hier jeweils 1 h bei Raumtemperatur, wobei der Puffer 3- 4x gewechselt werden sollte. Zur Detektion wird die Membran mit 1 ml ECL-Lösung für 1 min benetzt, zwischen zwei Lagen Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette zusammen mit dem Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia) für 1 bis 15 min (je nach zu detektierendem Protein und genutzten 1. und 2. AK) gelegt. Die Entwicklung erfolgt mit dem Gerät Curix 60 (AGFA). Nach der Entwicklung kann die Membran bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder gestrippt (siehe 4.2.2.6) werden

#### **4.2.2.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran mit $\beta$ -Mercaptoethanol)**

Die Membran wird mit 50 ml Strippuffer in einem 50 ml-Röhrchen 30 min bei 55 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Damit lassen sich alle primären und sekundären Antikörper von der Membran lösen. Nach einstündiger Blockierung der Membran mit 1 x TBS-T+ 5% Milchpulver und mehrmaligem Waschen in 1x TBS-T oder 1 h waschen und blockieren mit NET-G kann die Membran für einen weiteren immunochemischen Nachweis verwendet werden.

### **4.2.3 Methoden zur statistischen Auswertung**

#### **4.2.3.1 Quantifizierung der Bandenschwärzung**

Die bei der Immunodetektion gewonnenen Röntgenfilme werden eingescannt. Die Bilder werden entweder Subjektiv nach dem Schema: „1“= detektierte Bande; „0“= keine Bande detektiert ausgewertet, wodurch numerische Daten zur weiteren Analyse erhalten werden.

Alternativ werden die Bilder mit dem Programm „AIDA Image Analyzer v.3.11.“ geöffnet und es ist eine 1D-Evaluation mit der Bildeigenschaft Transmission auszuwählen. Um eine korrekte Farbdarstellung zu sehen wird die invertierte Grauskala genutzt.

Zunächst wird eine rechteckige Spur über die auszuwertenden Banden gelegt, dann werden die einzelnen Banden festgelegt und anschließend der Hintergrund bestimmt und abgezogen.

Um die Intensität und die Schwankungsbreite des Hintergrundes zu bestimmen, wird eine ebenso große Spur über einen Bereich gelegt, in dem keine Banden zu sehen sind. Hier werden ebenfalls mehrere Bandenbreiten bestimmt, welche die gleiche Größe haben sollten, wie die tatsächlichen, es wird jedoch kein Hintergrund abgezogen.

Es wird bei allen Banden die Signalintensität pro Fläche berechnet. Mit diesen Flächen kann die Standardabweichung als Maß für die Schwankungen des Hintergrundes bestimmt werden.

Die Werte der quantifizierten Banden werden mit dem Wert der zweifachen Standardabweichung des Hintergrundes verglichen, um festzustellen, welche Banden nur auf Hintergrundschwankungen und nicht auf ein spezifisches Signal zurückzuführen sind. Alle Werte kleiner als die zweifache Standardabweichung werden als „nicht detektiert“ deklariert.

Um eine allgemeine Normierung zu schaffen und verschiedene Blots untereinander vergleichen zu können, werden die als „detektiert“ deklarierten Werte durch den Wert eines auf allen Blots mitgeführten Standards geteilt (Kappes 2000). Die so erstellten metrischen Werte können für statistische Berechnungen verwendet werden.

#### **4.2.3.2 Korrelationsanalyse**

Besteht nach Betrachtung des Streudiagramms zweier Merkmale der Verdacht auf einen tendenziell linearen Zusammenhag zweier Merkmale, werden die auf den Standard normierten Werte aus der quantitativen Analyse mit Hilfe der SPSS-Software (Microsoft) auf ihre Korrelation überprüft und der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs.

Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen.

Bei Verdacht auf einen nichtlinearen, aber monoton fallenden oder steigenden Zusammenhang zweier Merkmale nach Betrachtung des Streudiagramms, wird der Korrelationskoeffizient nach Spearman zur Berechnung mittels SPSS (Microsoft) oben beschriebener Werte herangezogen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman misst, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben kann. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) monotoner Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Die Signifikanz wird zweiseitig gemessen. Diejenigen Korrelationskoeffizienten, deren p-Wert kleiner 0,05 ist, werden als signifikant betrachtet.

#### **4.2.3.3 Abhängigkeitsanalyse**

Zur Abhängigkeitsanalyse wurde mit SPSS nach Erstellung einer Kreuztabelle mit den zu untersuchenden Parametern, der Chi Quadrat ( $\chi^2$ ) Test nach Pearson - beziehungsweise bei Nichterfüllen der Voraussetzungen (kein Wert in der Vierfeldertafel darf eine erwartete Häufigkeit kleiner 5 haben) - wurde der Exakte Test nach Fisher benutzt.

Der Phi-Koeffizient ( $\phi$ ) beschreibt in der Statistik den Zusammenhang zweier dichotomer Merkmale (Merkmale, die nur je zwei Ausprägungen annehmen können, z.B. 0-1, ja-nein oder schwarz-weiß). Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Dabei ist 1 der stärkstmögliche Zusammenhang und 0 kein Zusammenhang.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Untersuchungen zur Aktivität verschiedener Mediatoren der STAT3-Signalaktivität in Tumorbiopsien kolorektaler Karzinompatienten**

In Vorarbeiten dieses Labors konnte gezeigt werden, dass STAT3 in CRC-Biopsien meist konstitutiv aktiv vorliegt (Corvinus et al. 2005). Um weitere Informationen über die STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom und über Korrelationen zu anderen Signalparametern zu gewinnen, wurde eine große Anzahl gut dokumentierter Tumorproben zur Informationsgewinnung genutzt.

#### **5.1.1 Analyse der STAT3-Aktivierung in Biopsiematerial von Kolorektalkarzinomen**

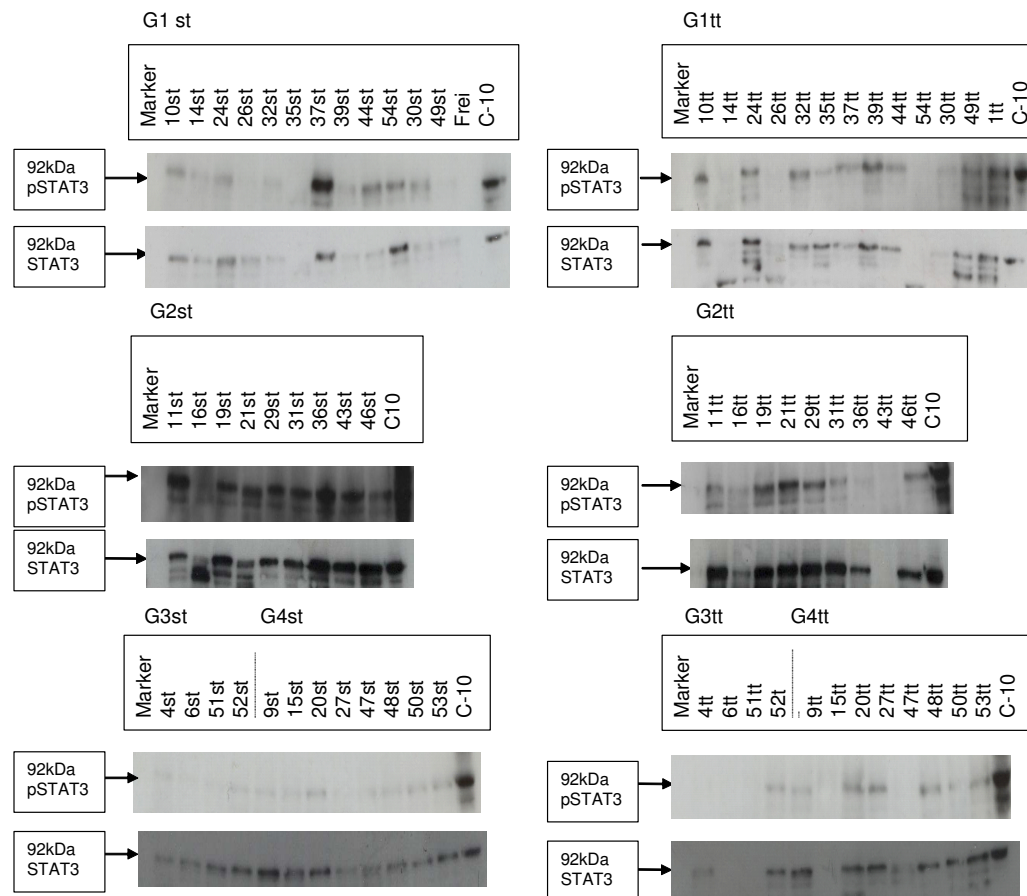
Zum Nachweis der STAT3-Aktivität im kolorektalen Karzinom wurden operativ gewonnene Gewebeproben aus dem Zentrum des Tumors (tt) sowie aus dem jeweils zugehörigem nicht entarteten Randgewebe (st) von 34 Patienten per Western Blot untersucht.

Nach Vorbereitung der Proben und Proteinbestimmung mittels Bradford wurden die Proben nach Tumorgraden (G1-G4) sortiert elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Um Unregelmäßigkeiten im Probenauftrag bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt, wodurch sämtliche Proteine angefärbt werden (Daten nicht gezeigt).

Zum Nachweis der STAT3-Phosphorylierung wurden die Membranen mit einem spezifischen Antikörper gegen phospho-STAT3 inkubiert und die Expressionskontrolle erfolgte mit dem STAT3-(H190)-Antikörper (Vgl. Abb. 4).

Als Positivkontrolle diente Lysat der C-10-Zelllinie, in der STAT3 konstitutiv aktiv vorliegt.





**Abb. 4: STAT3-Tyrosinphosphorylierung und -Expression in Biopsien des kolorektalen Karzinoms**

Biopsiematerial des Tumor (tt)- und zugehörigen Randgewebes (st) aus kolorektalen Tumoren von 34 Patienten wurde mechanisch aufgeschlossen und lysiert (Details Kapitel 4.2.2.1.). Je 20 µg der Proben wurden aufsteigend nach dem entsprechenden Tumorgrad (G1-G4) sortiert, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Tyrosin-705-Phosphoryliertes STAT3 analysiert.

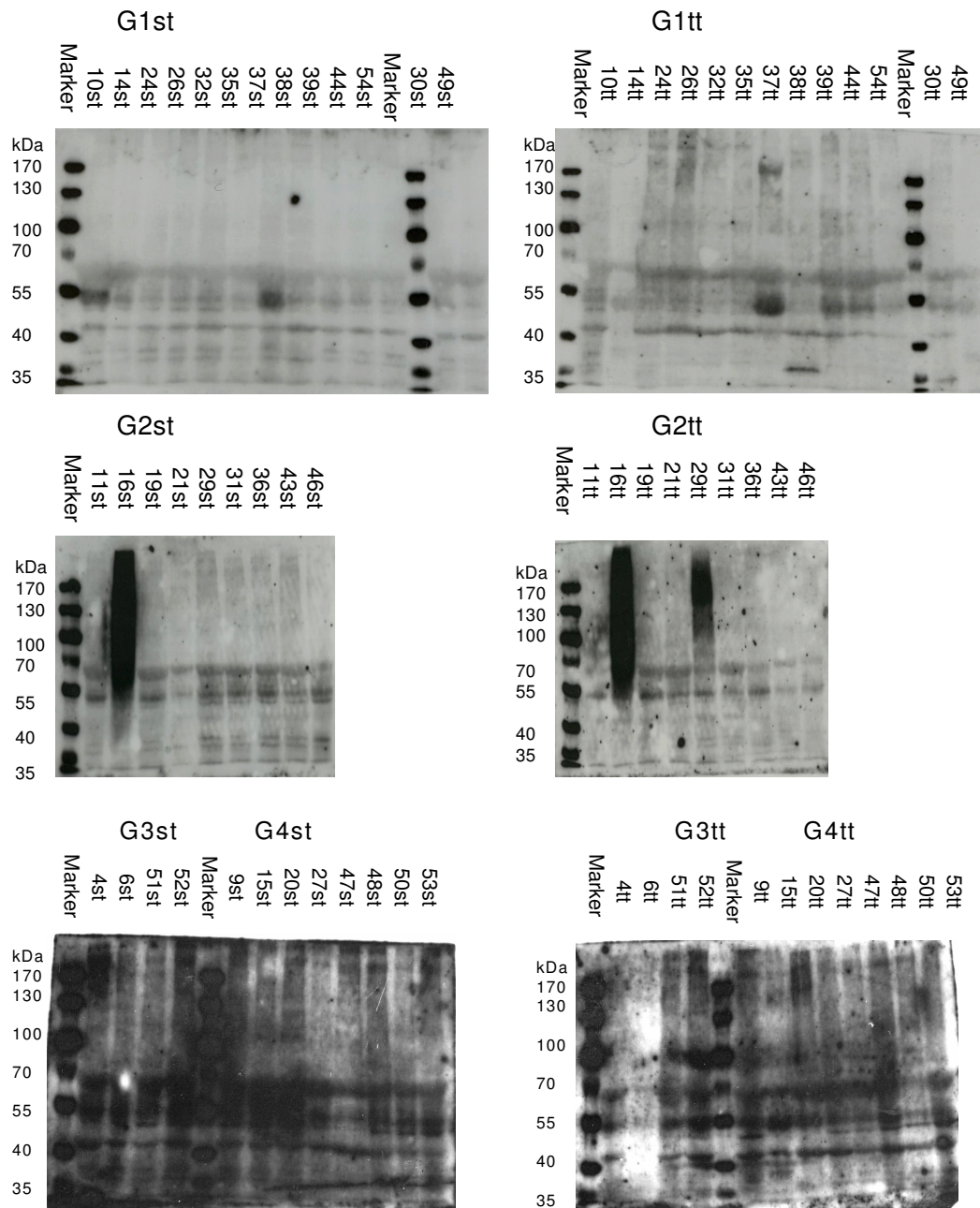
Die untere Reihe zeigt die STAT3-Expressionskontrolle mit einem gegen den STAT3-N-Terminus gerichteten Antikörper,  $\alpha$ STAT3 H190 welcher sowohl unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes STAT3 erkennt. Der Nachweis erfolgt auf der identischen Membran wie in der jeweils oberen Darstellung nach Entfernung des Phospho-STAT3-Antikörpers.

Bei dieser Analyse wurde festgestellt, dass STAT3 in 33 der 34 Proben sowohl im Rand- als auch im Tumorgewebe exprimiert, sowie in 28 Proben im Randgewebe und in 23 Proben im Tumorgewebe tyrosinphosphoryliert vorliegt.

Eine statistische Auswertung zur Korrelation der STAT3-Expression und dessen Tyrosinphosphorylierung mit dem Tumorgrad, sowie Untersuchungen zur gegenseitigen Abhängigkeit von Rand- und Tumorgewebe findet sich in den Kapiteln 5.1.4 und 5.1.6.

### **5.1.2 Übersicht über die globale Tyrosinphosphorylierung in kolorektalen Biopsien**

Viele Signalproteine ändern ihren Aktivitätszustand durch eine Tyrosinphosphorylierung. Um einen Überblick darüber zu bekommen, welche weiteren Mediatoren in den Tumoren der Patienten eine malignitätsassoziierte Rolle gespielt haben könnten, wurde eine Analyse mit einem Antikörper gegen Phospho- Tyrosin auf Blots mit jeweils 50 µg Proteinmenge je Probe durchgeführt. Dieser Antikörper bindet an alle tyrosinphosphorylierten Proteine, so dass ein Tyrosinphosphorylierungsmuster für jede Probe zur Verfügung steht. Das resultierende Bandenmuster (siehe Abb. 5) wurde mit den Ergebnissen der phosphoSTAT3- und STAT3-Detektionen (Abb. 4) verglichen, um anhand des Molekulargewichts der phosphorylierten Proteine Hinweise auf mögliche STAT3-Aktivatoren und -Effektoren zu erhalten und dies in gezielten Antikörpernachweisen zu überprüfen.



**Abb. 5: Analyse der globalen Tyrosinphosphorylierung in Biopsien des kolorektalen Karzinoms**  
 Je 50 µg der Biopsiematerialien wurden wie in Abb. 1 beschrieben mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde der Antikörper P-Tyr-100 gegen tyrosinphosphorylierte Proteine eingesetzt. Die Einteilung der Proben erfolgte getrennt nach Tumor- (tt) und Randgewebe (st) sowie aufsteigend sortiert nach dem Tumorgrad (G1-G4) der jeweiligen Probe.

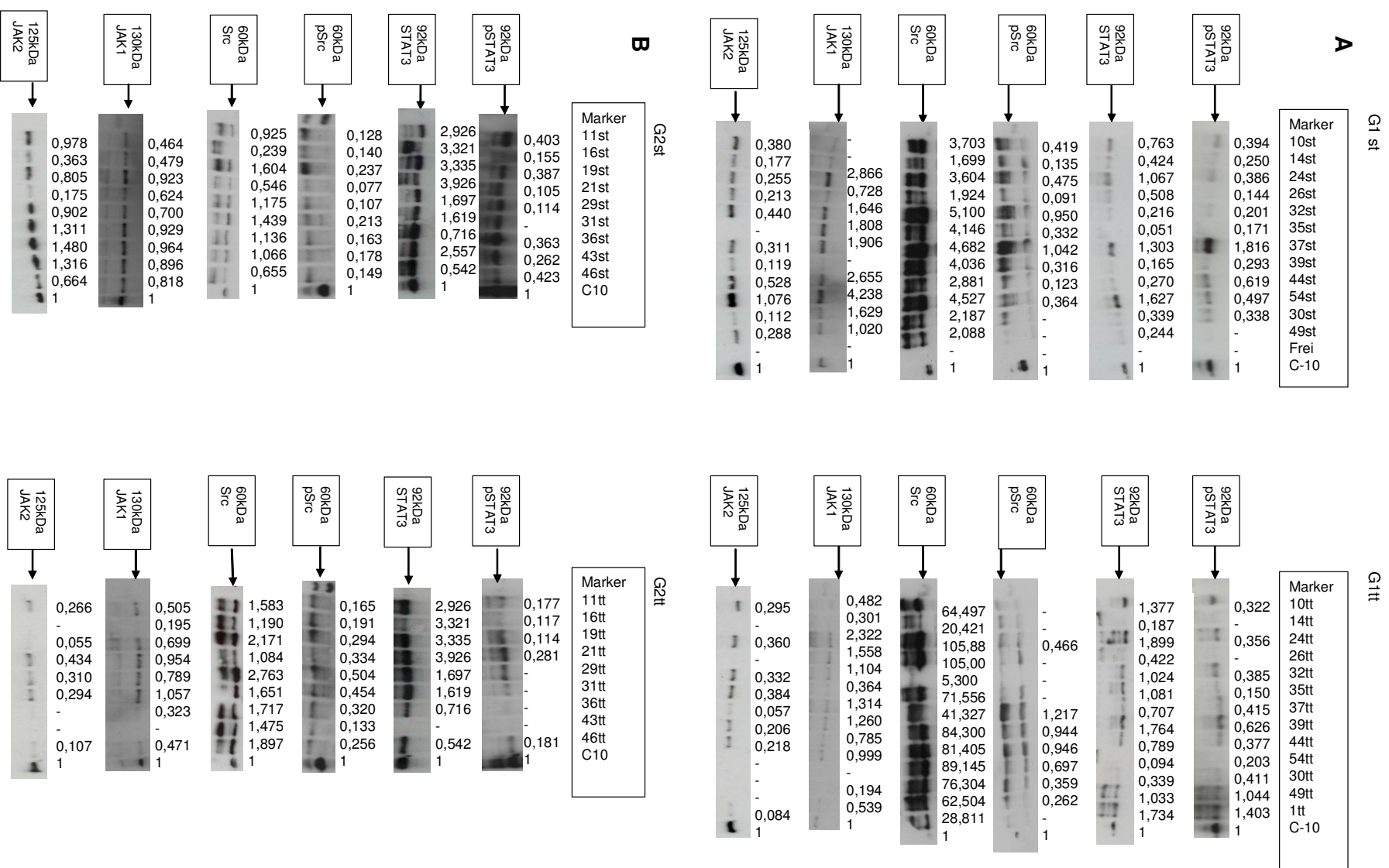
Beim direkten Vergleich der Phosphotyrosin-Blots (Abb. 5) mit denen der STAT3 Phosphorylierung (Abb. 4) fiel auf, dass gehäuft Banden im Bereich um 50 bis 60 kDa sowie 125 bis 130 kDa mit einer STAT3-Phosphorylierung einhergingen.

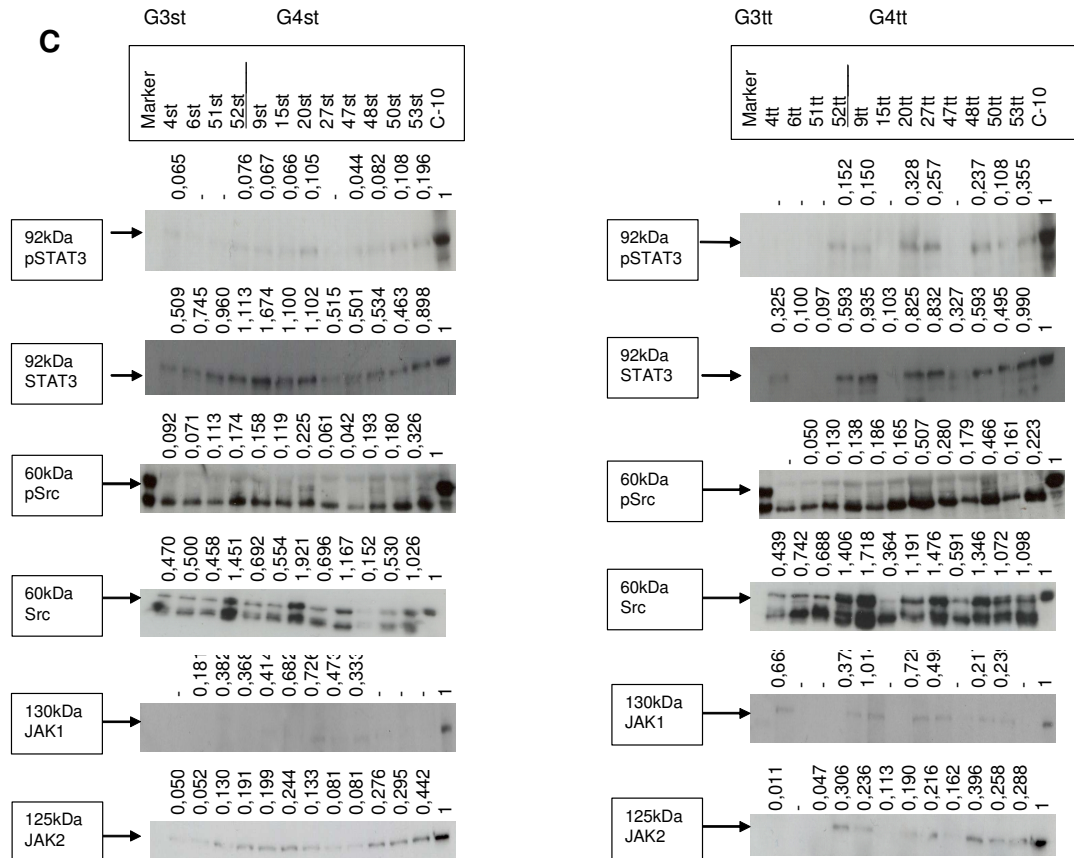
Des Weiteren fiel eine Bande bei 170 kDa auf, welche nur in Proben aus dem Tumorgewebe bei den Probennummern 37 (Tumorgrad G1) und 29 (Tumorgrad G2) auftritt. Fast in allen Proben gibt es eine Bande bei etwa 42 kDa. Bei den Proben 30 (ohne Tumorgradzuordnung) und 38 (Tumorgrad G1) im Tumorgewebe fällt eine Bande bei etwa 35 kDa auf, welche im Randgewebe nicht in dieser Intensität zu detektieren ist.

Die folgenden Untersuchungen beschränkten sich auf die Analyse der Banden um 60 kDa und 125 bis 130 kDa.

### **5.1.3 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung potentieller Mediatoren der STAT3-Aktivität**

Die vorangehende Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung der Gewebeproben führte aufgrund der Proteingrößen zu der Überlegung, dass sowohl Src (60 kDa) als auch JAK1 (130 kDa) und JAK2 (125 kDa) als Mediatoren der STAT3-Aktivität in den vorliegenden Gewebeproben in Betracht gezogen werden sollten. Außerdem wird in der Literatur häufig eine STAT3-Aktivierung durch diese Signalmediatoren in verschiedenen anderen Karzinomen beschrieben (Garcia et al. 2001, Yu et al. 1995, Frank 1999, Bromberg 2001). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden erneut Western Blots durchgeführt, um die Gewebeproben für Antikörperrnachweise gegen Src, JAK1, JAK2 sowie deren phosphorylierte Varianten verfügbar zu machen (siehe Abb. 6). Als Positivkontrolle wurde bei jedem Blot Lysat der Kolonkarzinom Zelllinie C-10 mitgeführt, in der laut eigenen Western Blot Analysen (Abb. 7, Abb. 9, Tab. 8) sowohl STAT3 als auch Src, JAK1 und JAK2 konstitutiv aktiviert vorliegen. Somit ist ein Vergleich der Blots untereinander durch Normierung auf diese Positivkontrolle möglich.





**Abb. 6 A-C (S. 39-40): Antikörpernachweise gegen pSTAT3, STAT3, pSrc, Src, JAK1 und JAK2 auf Western Blots von Gewebeproben aus kolorektalen Karzinomen von Patienten mit Tumoren der Grade G1 bis G4**

20 µg der jeweiligen Gewebelysate wurden wie bereits in Abb. 4 beschrieben zur Anfertigung von Western Blots eingesetzt und diese mit den entsprechenden Antikörpern gegen pSrc, Src, pJAK1, JAK1, pJAK2 und JAK2 inkubiert. Das Bandensignal wurde densitometrisch erfasst und mit Hilfe der „AIDA Image Analyzer“-Software quantifiziert. Das jeweilige Signal der stets mitgeführten Zelllinie C-10 wurde „1“ gesetzt und die quantifizierten Werte für alle Signale darauf bezogen (über der jeweiligen Spur). Werte, die in den Schwankungsbereich des Hintergrundes fallen, wurden als nicht detektiert (= -) gewertet. (Details Kapitel 4.2.3.1)

Die Proben wurden aufsteigend nach dem jeweiligen Tumorgrad (G1-G4) sortiert (A-C) und getrennt nach Tumor (tt)- und Randgewebe (st) aufgetragen.

#### 5.1.4 Korrelationsanalyse zum Aktivierungsstatus verschiedener potentieller STAT3 assoziierter Signalmoleküle

Für Korrelationsanalysen zum Aktivierungsstatus verschiedener potentieller STAT3-assoziierter Signalmoleküle wurden die Röntgenfilme, die bei den Antikörpernachweisen zur Detektion von Signalen genutzt wurden, eingescannt und die Intensität der jeweiligen Banden

mit der Software „AIDA Image Analyzer“ quantifiziert. Um Unterschiede bei den Expositions- und Inkubationszeiten vernachlässigen zu können, wurde bei jedem Blot dieselbe Positivkontrolle in derselben Konzentration als Standard mitgeführt, „1“ gesetzt und die ermittelten Werte damit abgeglichen. Zur Filterung von Schwankungen des Hintergrundes und Minimierung eines möglichen Fehlers wurde die Standardabweichung von Hintergrundmessungen des jeweiligen Blots bestimmt und alle Werte, die in den Schwankungsbereich der Standardabweichung fielen als nicht detektiert (= -) deklariert (Details Kapitel 4.2.3.1). In die Berechnung flossen somit nur die Werte ein, die außerhalb des Messfehlerbereiches lagen.

In dieser Korrelationsanalyse wurden jeweils zwei Signalmediatoren auf eine mögliche Korrelation ihrer Expressionen oder ihrer Phosphorylierung überprüft. Dazu wurde zunächst ein Streudiagramm angefertigt. Zeigte dieses einen tendenziell linearen Zusammenhang, wurde dieser mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson auf seine Stärke überprüft.

In Tab. 4 sind die Korrelationen aufgeführt, deren Korrelationskoeffizient signifikant ( $p < 0,05$ ) von 0 abweicht.

Randgewebe		Korrelationskoeffizient nach Pearson	Tumorgewebe		Korrelationskoeffizient nach Pearson
pSTAT3	mit pSrc	0,657			
	Src	0,511			
STAT3	mit JAK2	0,353	pSrc	mit JAK1	0,49
pSrc	mit pSTAT3	0,673			
	Src	0,778			
	JAK1	0,483			
Src	mit pSTAT3	0,541	JAK1	mit pSrc	0,49
	pSrc	0,778			
	JAK1	0,795			
JAK1	mit pSrc	0,483			
	Src	0,795			
JAK2	mit STAT3	0,353			

**Tab. 4: Korrelationsanalyse verschiedener Signalmediatoren zueinander**

Durchgeführt wurde eine Korrelationsanalyse, in der die Korrelation der Proteinexpression (STAT3, Src, JAK1, JAK2), bzw. -phosphorylierung (pSTAT3, pSrc) eines Signalmediators zu der eines

anderen untersucht wurde. Zur Berechnung wurden die Banden aus den entsprechenden Detektionen der Antikörpernachweise mit der „AIDA Image Analyzer“-Software quantifiziert. Die entsprechenden zur Berechnung verwendeten Werte finden sich in Abb. 3. Die Stärke des linearen Zusammenhangs wird durch den Korrelationskoeffizienten beschrieben. Je stärker er sich +1 annähert, umso stärker ist der positiv lineare Zusammenhang (Details Kapitel 4.2.3.2.).

### 5.1.5 Überprüfung zur statistischen Abhängigkeit der Signalaktivität vom Tumorgrad (G1-G4)

In der Literatur wurde bereits vielfach die Bedeutung der Aktivität einzelner Signalmediatoren in Abhängigkeit vom Tumorgrad diskutiert (Kawada et al. 2006, Liu et al. 2007, Mizoguchi et al. 2006, Orth 2003). Um die hier vorliegenden Biopsien bezüglich dieser Frage zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von Western Blots mit Biopsiematerial kolorektaler Tumoren aus allen vier Tumorgraden mit der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. (Details siehe Kapitel 4.2.3.2)

Die Korrelationsanalyse der Proteinexpression bzw. der Proteinphosphorylierung in Abhängigkeit vom Tumorgrad zeigte ausschließlich negative Korrelationen. Dies bedeutet eine Abnahme der Phosphorylierung bei steigendem Tumorgrad. Die signifikanten Korrelationen sind in Tab. 5 aufgeführt.

Randgewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman	Tumorgewebe	Korrelationskoeffizient nach Spearman
pSTAT3	-0,702		
Src	-0,72	Src	-0,829
JAK1	-0,799		

**Tab. 5: Korrelationsanalyse einzelner Signalmediatoren mit dem Tumorgrad (G1-G4)**

Aufgeführt sind signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) der Proteinexpression bzw. -phosphorylierung verschiedener Signalmediatoren im kolorektalen Karzinom mit dem Tumorgrad (G1-G4) getrennt nach Randgewebe und Tumorgewebe. Die zur Berechnung genutzten Werte finden sich in Abb.3.

### 5.1.6 Unterschiede im Aktivierungsstatus zwischen Rand- und Tumorgewebe

Um eine mögliche wechselseitige Abhängigkeit von Expressions- bzw. Phosphorylierungsgrad eines Signalmediators in Rand- und zugehörigem Tumorgewebe herauszufiltern, wurden die aus der densitometrischen Auswertung gewonnenen Werte in einem Streudiagramm aufgetragen. Wurde ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen



der Expression oder Tyrosinphosphorylierung der Signalmediatoren in Rand- und Tumorgewebe vermutet, wurden die entsprechenden Werte für eine Korrelationsanalyse nach Pearson genutzt, um eine mögliche Korrelation zu untersuchen. Korrelationen zeigten sich ausschließlich bei STAT3 (Korrelationskoeffizient: 0,805) und pSrc (Korrelationskoeffizient: 0,68). Bei diesen Proteinen ist also die Expression bzw. die Tyrosinphosphorylierung eines Proteins im Randgewebe dann ausgeprägter, wenn sie ebenfalls im Tumorgewebe stark ausgeprägt ist.

## **5.2 Untersuchung zur Aktivität verschiedener Mediatoren der STAT3-Signalaktivität in Lysaten permanenter Kolonkarzinom (CRC-) Zelllinien**

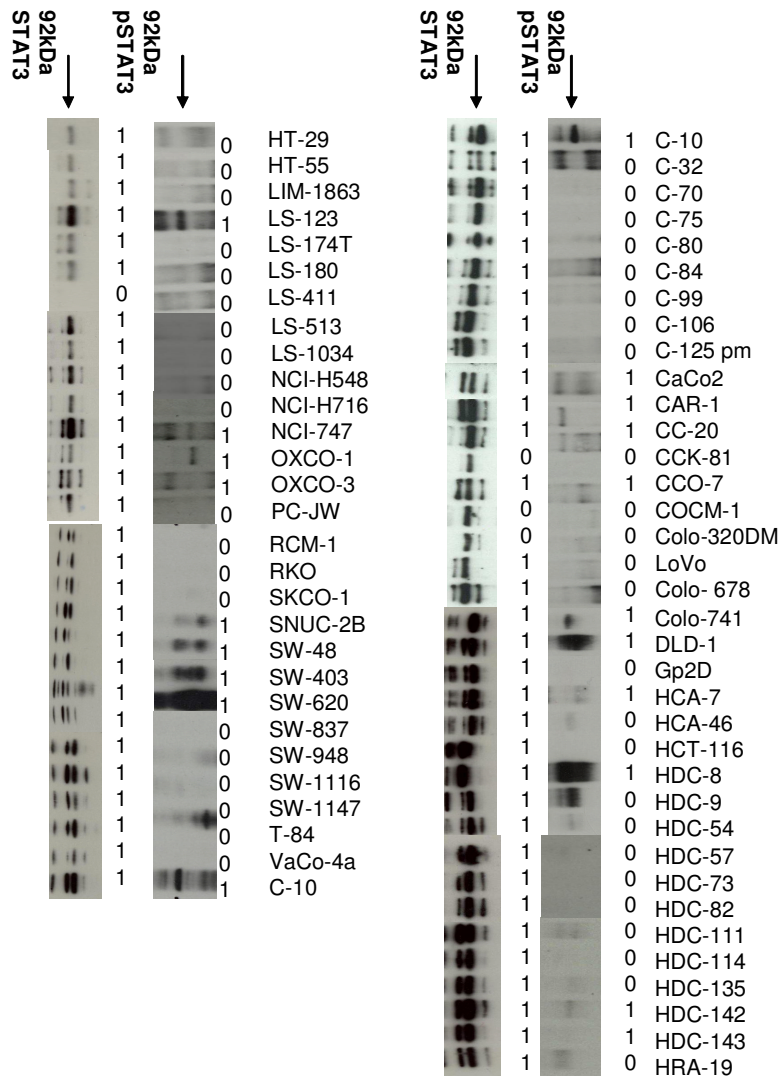
Aus einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Stephan Feller (University of Oxford) standen Lysate von 64 permanenten Zelllinien zur Verfügung, welche von kolorektalen Karzinomen abgeleitet wurden. Dies ist zurzeit die weltweit größte Kollektion CRC-abgeleiteter Zelllinien. Diese Lysate wurden per SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western Blot auf Nitrocellulosemembranen übertragen, um sie für Analysen mit verschiedenen Antikörpern zugänglich zu machen. Diese Untersuchungen sollen einen Überblick über die Variabilität der Expression und Phosphorylierung verschiedener Mediatoren und Effektoren der STAT3-Signalaktivität im CRC ermöglichen.

### **5.2.1 Analyse der STAT3-Aktivierung in Lysaten CRC-abgeleiteter Zelllinien**

Um wie auch zuvor in den Tumorbiopsien (Abb. 4) einen Überblick über den STAT3 Expressions- und Phosphorylierungsgrad in den CRC Zelllinien zu erhalten, wurden die Nitrozellulosemembranen mit einem Antikörper gegen STAT3 bzw. gegen phospho-STAT3 untersucht.

In Abb. 7 sind die entsprechenden Detektionen gezeigt.

In 60 der 64 Zelllinien wird STAT3 exprimiert, wobei in 19 dieser 60 Zelllinien STAT3 außerdem in konstitutiv tyrosinphosphorylierter Form vorliegt.

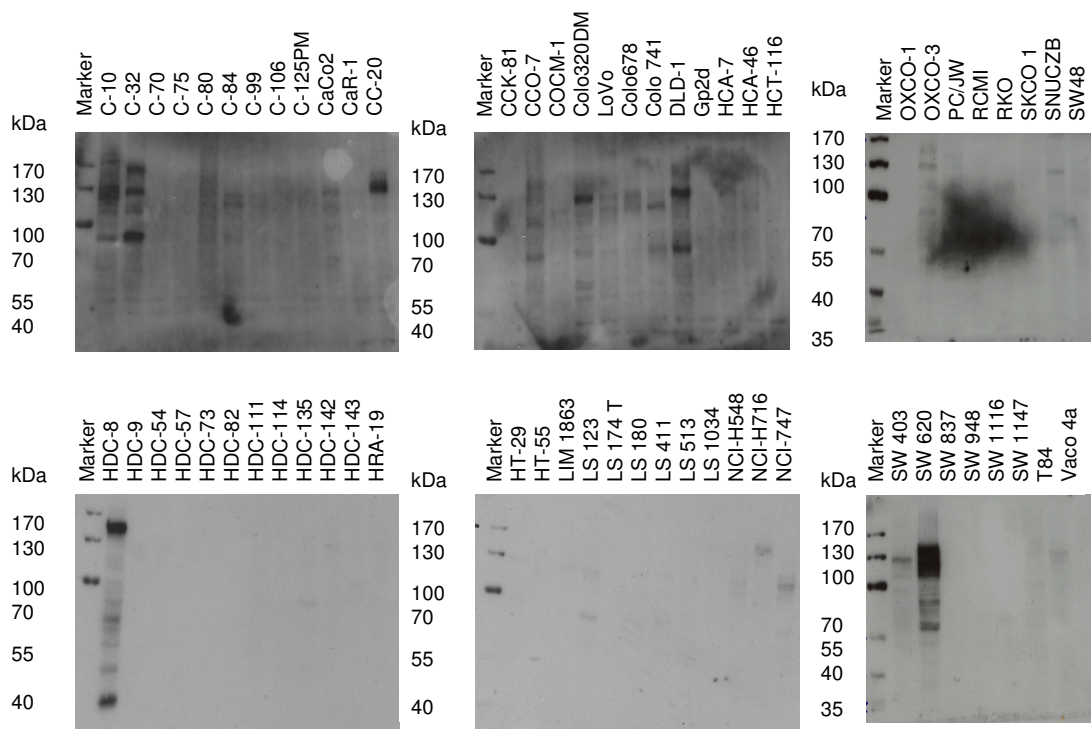


**Abb. 7: Untersuchung der Expression und Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in 64 CRC-abgeleiteten Zelllinien**

Gezeigt sind Detektionen von Western Blots permanenter CRC-Zelllinien nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Phospho-STAT3 sowie anschließender Nachdetektion mit Anti-STAT3.

### 5.2.2 Übersicht über die globale Tyrosinphosphorylierung in Lysaten von CRC-Zelllinien

Zur Beurteilung des Tyrosinphosphorylierungszustandes der in den CRC Zelllinien exprimierten Proteine wurden Western Blots der Lysate mit einem Antikörper gegen phospho-Tyrosin inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8: Übersicht über das globale Tyrosinphosphorylierungsmuster in 64 CRC-abgeleiteten Zelllinien**

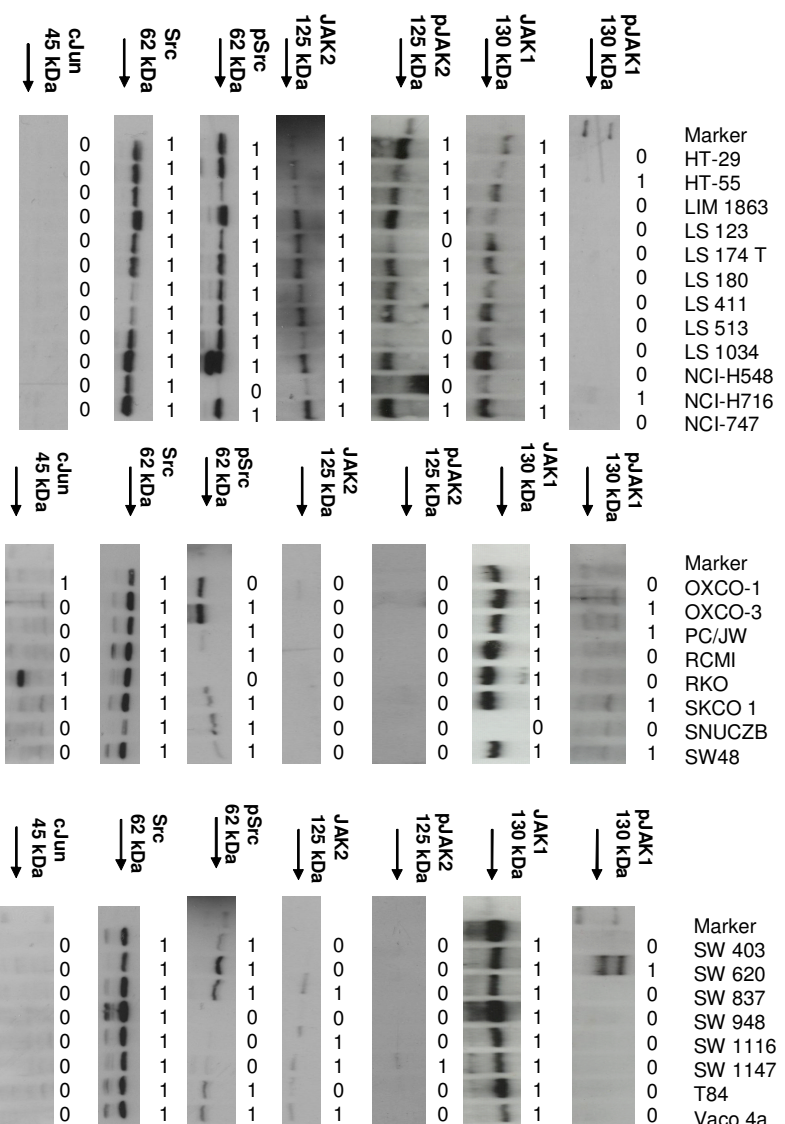
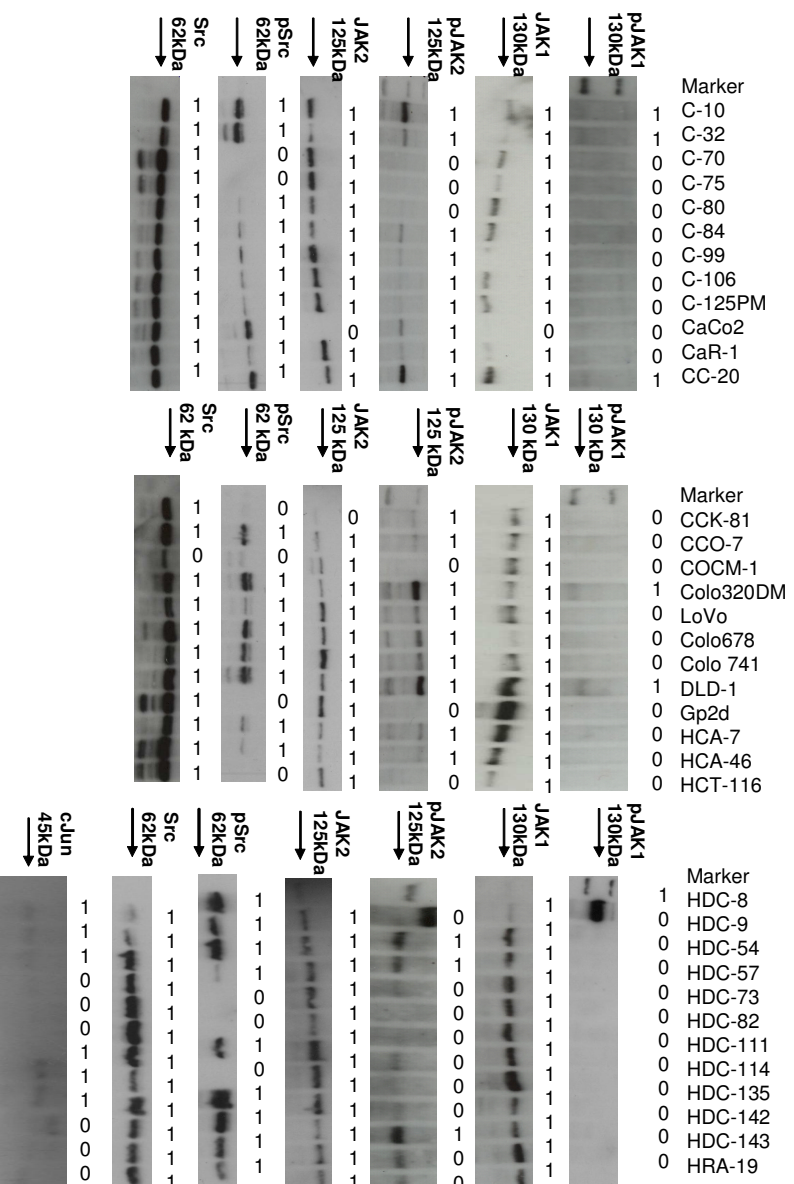
Je 15 µg der Zelllinienlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, per Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem P-Tyr-100-Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine inkubiert. Gezeigt sind die detektierten Filme.

Auch hier waren wie bei den Tumorbiopsien (Kap.5.1.2) vor allem Banden im Bereich um 130, 90 und 60 kDa zu verzeichnen.

In vielen Zelllinien zeigte sich jedoch mit diesem Verfahren lediglich ein geringer Grad an Tyrosinphosphorylierung.

### **5.2.3 Untersuchung der Signalaktivität potentieller Mediatoren der STAT3-Aktivität in Lysaten von CRC-Zelllinien**

Um an Hand der Molekulargewichte der detektierten tyrosinphosphorylierten Proteinen (Abb. 8) zu überprüfen, ob es sich dabei um die Signalmediatoren JAK1 (130 kDa), JAK2 (125 kDa) und Src (60 kDa) handelt, wurden erneut Western Blots wie oben beschrieben erstellt und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach Detektion der Proteinexpression, bzw. -phosphorylierung (Abb. 9) wurde die Bandenintensität subjektiv beurteilt und in Tab. 6 aufgelistet. Dabei bedeutet „0“, dass keine Bande erkennbar ist und „1“ eine sichtbare Bande.



**Abb. 9 (S. 47): Detektionen von pJAK1, pJAK2, pSRC, JAK1, JAK2, SRC und cJun in 64 CRC-Zelllinien**

15 µg von Lysaten permanenter CRC Zelllinien wurden elektrophoretisch aufgetrennt, per Western Blot auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die parallel erstellten Membranen wurden mit den jeweils benannten Antikörpern inkubiert. Das Auftreten von Banden wurde subjektiv beurteilt und über dem entsprechenden Signal notiert, wobei „1“ das Auftreten einer sichtbaren Bande und „0“ deren Abwesenheit bedeutet.

Zelllinie	Stat3	pStat3	Jak1	Jak2	pJAK1	pJAK2	src	psrc	c-Jun
C-10	1	1	1	1	1	1	1	1	0
C-32	1	0	1	1	1	1	1	1	0
C-70	1	0	1	1	0	0	1	0	0
C-75	1	0	1	1	0	0	1	0	0
C-80	1	0	1	1	0	0	1	1	0
C-84	1	0	1	1	0	1	1	1	0
C-99	1	0	1	1	0	1	1	1	0
C-106	1	0	1	1	0	1	1	1	0
C-125PM	1	0	1	1	0	1	1	1	0
CaCo2	1	1	0	0	0	0	1	1	0
CaR-1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
CC-20	1	1	1	1	1	1	1	1	0
CCK-81	0	0	1	1	0	1	1	0	0
CCO-7	1	1	1	1	0	1	1	1	0
COCM-1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Colo320DM	0	0	1	1	1	1	1	1	0
LoVo	1	0	1	1	0	1	1	1	0
Colo678	1	0	1	1	0	1	1	1	0
Colo741	1	1	1	1	0	1	1	1	0
DLD-1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Gp2d	1	0	1	1	0	0	1	0	0
HCA-7	1	1	1	1	0	1	1	1	0
HCA-46	1	0	1	1	0	1	1	1	0
HCT-116	1	0	1	1	0	0	1	0	0
HDC-8	1	1	1	1	1	0	1	1	1
HDC-9	1	0	1	1	0	1	1	1	1
HDC-54	1	0	1	1	0	1	1	1	1
HDC-57	1	0	1	1	0	0	1	1	0
HDC-73	1	0	1	1	0	0	1	0	0
HDC-82	1	0	1	1	0	0	1	0	0
HDC-111	1	0	1	1	0	0	1	1	1
HDC-114	1	0	1	1	0	0	1	0	1
HDC-135	1	0	1	1	0	0	1	1	1
HDC-142	1	1	1	1	0	1	1	1	0
HDC-143	1	1	1	1	0	0	1	1	0
HRA-19	1	0	1	1	0	0	1	1	0
HT-29	1	0	1	1	0	1	1	1	0
HT-55	1	0	1	1	1	1	1	1	0
LIM 1863	1	0	1	1	0	1	1	1	0
LS 123	1	1	1	1	0	1	1	1	0
LS 174 T	1	0	1	1	0	0	1	1	0
LS 180	1	0	1	1	0	1	1	1	0
LS 411	0	0	1	1	0	1	1	1	0
LS 513	1	0	1	1	0	1	1	1	0
LS 1034	1	0	1	1	0	0	1	1	0
NCI-H548	1	0	1	1	0	1	1	1	0
NCI-H716	1	0	1	1	1	0	1	0	0
NCI-747	1	1	1	1	0	1	1	1	0
OXCO-1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
OXCO-3	1	1	1	0	1	0	1	1	0
PC/JW	1	0	1	0	1	0	1	1	0
RCMI	1	0	1	0	0	0	1	1	0
RKO	1	0	1	0	0	0	1	0	1
SKCO 1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
SNU CZB	1	1	0	0	0	0	1	1	0
SW 48	1	1	1	0	1	0	1	1	0
SW 403	1	1	1	0	0	0	1	1	0
SW 620	1	1	1	0	1	0	1	1	0
SW 837	1	0	1	1	0	0	1	1	0
SW 948	1	0	1	0	0	0	1	0	0
SW 1116	1	0	1	1	0	0	1	0	0
SW 1147	1	0	1	1	0	1	1	0	0
T84	1	0	1	0	0	0	1	1	0
Vaco 4a	1	0	1	1	0	0	1	1	0
<b>Summe</b>	<b>60</b>	<b>19</b>	<b>62</b>	<b>51</b>	<b>13</b>	<b>30</b>	<b>63</b>	<b>49</b>	<b>9</b>
	<b>Stat3</b>	<b>pStat3</b>	<b>Jak1</b>	<b>Jak2</b>	<b>pJAK1</b>	<b>pJAK2</b>	<b>src</b>	<b>psrc</b>	<b>c-Jun</b>

**Tab. 6 (S. 49): Expression bzw. Phosphorylierung verschiedener Signalmediatoren in CRC-Zelllinien**

Darstellung einer subjektiven Analyse per Western Blot erhobener Expressions- bzw. Tyrosinphosphorylierungsdaten, welche in Abb. 7 und 9 gewonnen wurden. Hierbei entspricht „1“ einer sichtbaren Bande und „0“ dem Fehlen einer Bande.

**5.2.4 Statistische Analyse möglicher gegenseitiger Abhängigkeiten der Expression bzw. Tyrosinphosphorylierung von Signalmediatoren in CRC-Zelllinien**

Es wurde überprüft, ob es bei Betrachtung zweier Signalmediatoren gegenseitige Abhängigkeitsbeziehungen bei deren Expression oder Tyrosinphosphorylierung gibt. Dazu wurden die Werte aus Tab. 6 mit Hilfe des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ ) bzw. bei nicht erfüllen der dafür erforderlichen Voraussetzungen mit dem Exakten Test nach Fisher untersucht. (Details siehe Kapitel 4.2.3.3).

Die Ergebnisse (vgl. Tab. 7) sprechen für eine schwache gegenseitige Abhängigkeit von pSTAT3 und pSrc. Mittlere Abhängigkeiten gibt es zwischen pSTAT3 und pJAK2, zwischen pSTAT3 und pJAK1, sowie zwischen pJAK2 und pSrc.

Signalmediatoren		$\chi^2$ /Fisher	Stärke der Abhängigkeit Phi
pSTAT3	pSrc	0,049	0,279
pSTAT3	pJAK2	0,023	0,31
pSTAT3	JAK2	0,045	0,267
JAK1	JAK2	0,039	0,356
pJAK2	pSrc	0,003	0,389

**Tab. 7: Abhängigkeit der Proteinexpression, bzw. der Proteinphosphorylierung zweier Proteine**

Mit dem Chi Quadrat Test ( $\chi^2$ ) bzw. dem exakten Test nach Fisher wurde getestet, ob die beiden jeweils benannten Signalmediatoren bezüglich ihrer Expression bzw. Tyrosinphosphorylierung voneinander abhängig sind. Die signifikant voneinander abhängigen Signalmediatoren ( $p < 0,05$ ) sind in der Tabelle aufgelistet. Besteht eine Abhängigkeit, wird durch Berechnung des Phi-Koeffizienten die Stärke der Abhängigkeit bestimmt.

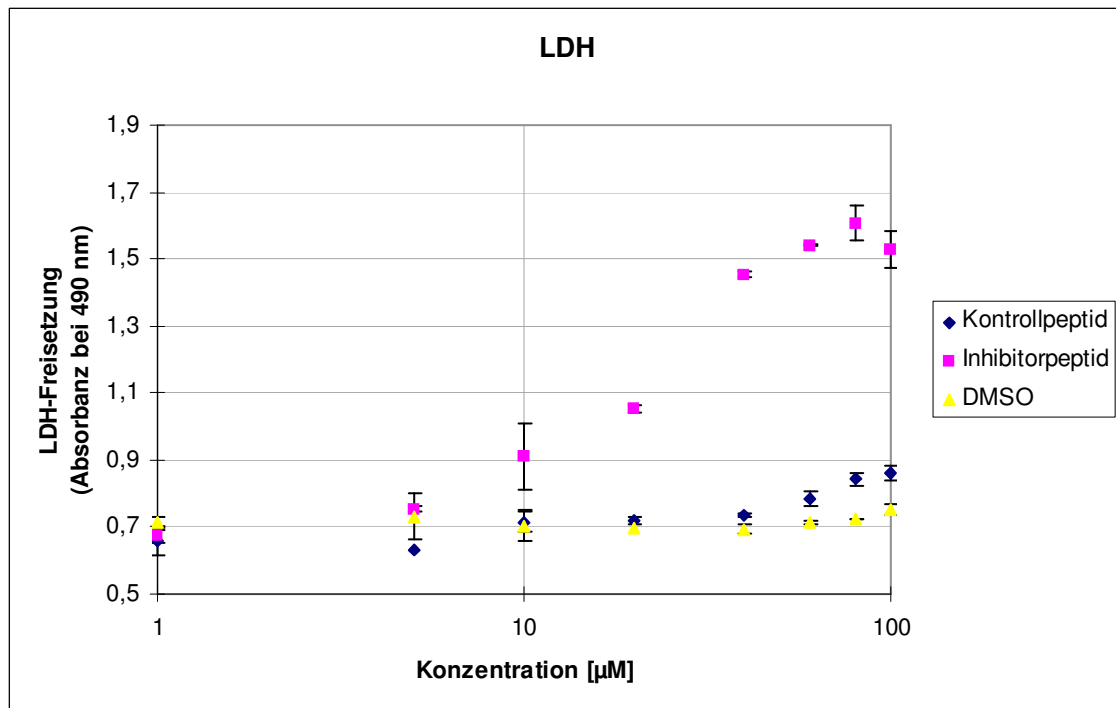


### **5.3 Untersuchung von STAT3-assoziierten Signalwegen in der Kolonkarzinom Zelllinie C-10**

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, können STAT3, JAK 1 und 2 sowie Src im kolorektalen Karzinom phosphoryliert auftreten, wobei es zudem Abhängigkeitsbeziehungen sowie Korrelationen zwischen den einzelnen Signalmolekülen geben kann. Wie in Abb. 7 und 9, sowie Tab. 6 zu sehen ist, liegen all diese Signalmediatoren in der adhärent wachsenden CRC Zelllinie C-10 in phosphorylierter Form vor. Dadurch eignet sich diese Zelllinie im Besonderen für Inhibitionsversuche, in denen untersucht werden kann, was ein Ausbleiben der Phosphorylierung des jeweiligen Signalparameters für das Zellwachstum und das Zellüberleben bedeutet.

#### **5.3.1 Inhibition von STAT3**

Um zu überprüfen, welche Effekte ein Verlust der konstitutiven STAT3-Aktivität auf die C-10 Zellen hat, wurde die STAT3-Aktivität durch das STAT3-Inhibitorpeptid OMT - ein Peptidomimetikum - gehemmt, welches die Dimerisierung der phosphorylierten STAT3-Monomere - durch Bindung an die SH<sub>2</sub>-Domäne – verhindert (Dourlat et al. 2007). Zur Bestimmung der mittleren Wirkkonzentration des Inhibitorpeptids und um zu überprüfen, ob eine STAT3-Inhibition zytotoxisch wirkt, wurde ein LDH-Test, der die Zelllyse anhand dadurch steigender freier LDH-Konzentrationen misst, mit einer Konzentrationsreihe von 1 bis 100 µM an Inhibitor bzw. einem nicht wirksamen aber strukturell ähnlichen Kontrollpeptids durchgeführt. Dabei war mit zunehmender Inhibitorkonzentration eine deutliche Zytotoxizität zu verzeichnen. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) des Inhibitors konnte mit 20 bis 40 µM bestimmt werden.



**Abb. 10: Analyse der spezifischen Zytotoxizitätswirkung des STAT3-Dimerisierungsinhibitors OMT in der CRC-Zelllinie C-10**

6000 Zellen wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen der Peptide inkubiert und die freigesetzte LDH Menge anhand der Bildung eines bei 490 nm absorbierenden Produktes bestimmt.

Um die Effekte einer spezifischen STAT3-Inhibition auf die Zellmorphologie zu untersuchen, wurden C-10-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitor- und Kontrollpeptids inkubiert und die Auswirkungen zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopisch analysiert. Beispiele sind in Abb. 11 dargestellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine direkte STAT3-Inhibition zu einem spezifischen Verlust der Zellintegrität führt.

Inhibition der C-10 Zellen  
über 3 Stunden mit 80µM  
des STAT3 Inhibitorpeptides  
OMT

Inkubation der C-10  
Zellen über 3 Stunden  
mit 80µM des STAT3  
Kontrollpeptides

C-10 Zellen 3 Stunden  
nach Mediumwechsel,  
ohne Inhibitorzugabe



**Abb. 11 Lichtmikroskopische Effekte einer STAT3-Inhibition in der CRC-Zelllinie C-10**

### 5.3.2 Inhibition von Src

Weil phosphoryliertes Src in vielen Fällen sowohl in den Tumorbiopsien, als auch in den Zelllinien gleichzeitig mit phosphoryliertem STAT3 auftritt (vgl. Tabelle 4 und 9), erschien die Möglichkeit, dass es ein vorgeschalteter Signalmediator von STAT3 ist, als wahrscheinlich. Außerdem beschreiben Emaduddin *et al.* eine Fehlregulation des Src-Signalweges in C-10 Zellen, wobei die Rezeptortyrosinkinase c-Met ungewöhnlicherweise durch Src phosphoryliert wird (Emaduddin *et al.* 2008) und nicht umgekehrt, wie in anderen Fällen beschrieben (Rahimi *et al.* 1998, Mueller *et al.* 2008).

Um zu überprüfen, ob Src in den C-10-Zellen außerdem für eine STAT3-Aktivierung verantwortlich ist, wurden die Zellen mit dem Inhibitor PP2 behandelt, welcher die Src-Phosphorylierung verhindert. Weil eine Inhibitorkonzentration von 30 µM in den C-10 Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Proliferation führt (Emaduddin *et al.* 2008), wurde diese Konzentration eingesetzt, um eine eventuell dadurch einsetzende STAT3-Inhibition zu überprüfen. Obwohl eine effiziente Inhibierung der Src-Phosphorylierung zu erkennen war

und trotz unterschiedlich langer Inkubationszeiten, konnte, wie aus Abb. 12 A ersichtlich, keine Inhibition der STAT3-Phosphorylierung detektiert werden.

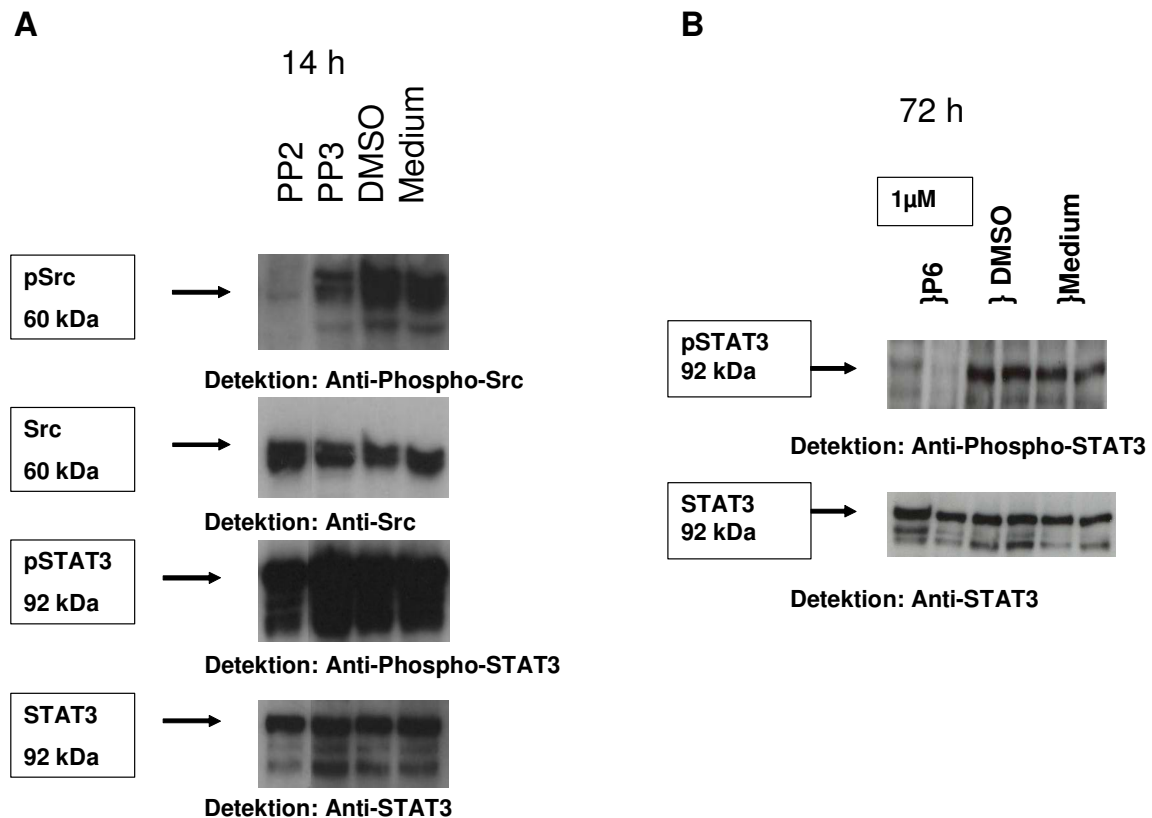
Wie Cramer *et al.* zeigen konnten, ist die Rezeptortyrosinkinase (RTK) c-Met in Fibroblasten in der Lage, STAT3-Aktivität herbeizuführen (Cramer et al. 2005). Um zu überprüfen, ob die RTK c-Met auch für die konstitutive STAT3-Aktivität in den C-10-Zellen verantwortlich ist, wurde c-Met durch den spezifischen Met-Kinase-Inhibitor SU11274 über verschiedene Zeiträume in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  inhibiert und anschließend die STAT3-Phosphorylierung per Western Blot evaluiert. Jedoch kam es auch hier zu keinem Zeitpunkt zu einer durch Western Blot detektierbaren STAT3-Inhibition (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.3 Inhibition von Januskinasen

Da laut eigenen Analysen auch aktivierte Januskinasen für eine STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom in Frage kommen und die Inhibition mittels Src- oder Met-Kinase-Inhibitor zu keinerlei Abnahme der STAT3-Phosphorylierung führen konnten, wurde zusätzlich eine Inhibition der Januskinasen 1 und 2 mit Hilfe des JAK Inhibitors P6 durchgeführt. Dabei wurden sowohl Inhibitionszeit wie auch Inhibitorkonzentrationen variiert und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei kam es zu einer progressiven Abnahme der STAT3-Phosphorylierung bei einer Inhibitionszeit von 72 h und Inhibitorkonzentrationen von 1 bis 5  $\mu\text{M}$  (beispielhaft siehe Abb. 12 B). Bei den Konzentrationen, die zu einer Abnahme der STAT3-Phosphorylierung führten, konnte jedoch zu keiner Zeit eine Inhibition der JAK-Phosphorylierung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob eine JAK-Inhibition der C-10 Zellen, wie schon bei Myelomazellen beschrieben, Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat, wurde ein Proliferationsassay über 3 Tage mit Konzentrationen von 0,125 bis 1,25  $\mu\text{M}$  durchgeführt, da diese Konzentrationen in Myelomazellen zu einer deutlichen Wachstumsinhibition führen (Pedranzini et al. 2006). Hierbei kam es jedoch zu keiner signifikanten Veränderung des Proliferationsverhaltens der C-10 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Auch mikroskopisch war keine Veränderung der Zellintegrität feststellbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12 Effekte der Inhibition der Src- (A) und JAK-Aktivität (B) in der CRC-Zelllinie C-10 auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3**

A: In Zellen der CRC-Zelllinie C-10 wurde Src mit dem Inhibitor PP2 in einer Konzentration von 30  $\mu$ M über verschiedene Zeitperioden inhibiert (hier beispielhaft 14 h). Als Kontrolle diente PP3. Um Effekte des Lösungsmittels zu detektieren, wurden einige Zellen nur mit der entsprechenden DMSO-Menge inkubiert. Anschließend wurden mit den Lysaten der inhibierten Zellen Western Blots angefertigt und mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Die Effekte, welche lediglich auf einen Mediumwechsel zurückzuführen sind, sieht man in der letzten Spur.

B zeigt Antikörperdetektionen von pSTAT3 und STAT3 auf Western Blots JAK-inhibierter C-10 Zellen in Doppelbestimmungen. Die Inhibition der C-10 Zellen erfolgte durch Zugabe von 1  $\mu$ M des JAK Inhibitor I (P6) und Inkubation über 72 Stunden. Nach Lyse der Zellen wurden 20  $\mu$ g Protein elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss an einen Western Blot erfolgten Antikörpernachweise gegen pSTAT3, STAT3, pJAK1, JAK1, pJAK2 und JAK2.

## 6. Diskussion

### 6.1 STAT3-Aktivität in Tumor- und nicht entartetem Randgewebe des kolorektalen Karzinoms

Wie sich in den letzten Jahren herausstellte, kommt fehlgeleiteter Signaltransduktion - und im Besonderen auch dem fehlregulierten JAK/STAT-Signalweg - eine große Bedeutung in der Entstehung maligner Tumoren zu.

Zur Gewinnung neuerer Erkenntnisse in der Tumorigenese des kolorektalen Karzinoms wurden vergleichende Untersuchungen an Biopsiematerial aus 34 kolorektalen Tumoren verschiedener Tumorgade und dem zugehörigen nicht entartetem Randgewebe durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die STAT3- und die Src-Expression in den zusammengehörigen Proben zwar nahezu gleich ist, es jedoch deutliche Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung gibt. So sind die untersuchten Signalmediatoren im Randgewebe häufiger tyrosinphosphoryliert als im Tumorgewebe und es lässt sich lediglich für Src eine signifikante positiv lineare Korrelation der Proteinphosphorylierung zwischen Rand- und Tumorgewebe herstellen.

Für diverse Tumorarten, wie z.B. das Mammakarzinom, ist eine spezifische STAT3-Aktivierung bekannt, welche sich weitgehend auf das Tumorgewebe beschränkt (Watson und Miller 1995). Vorangehende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnten in Biopsien kolorektaler Karzinome jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der STAT3-Aktivität im Tumor- und Randgewebe nachweisen (Corvinus 2005). Auch Dhir *et. al.*, welche Untersuchungen am Prostatakarzinom durchführten, konnten einen solchen Unterschied nicht feststellen, wohl aber zu gesundem Prostatagewebe von Organspendern, welches eine deutlich geringere STAT3-Aktivität zeigte (Dhir et al. 2002). Für diese Tatsache könnten mehrere Aspekte verantwortlich sein.

Zum einen können im Tumorrand bereits prämaligene Veränderungen vorliegen, die zwar lichtmikroskopisch noch nicht erkennbar sind, sich jedoch biochemisch schon anhand der STAT3-Aktivität nachweisen lassen (Dhir et al. 2002). Es könnten aber auch vom Tumorgewebe sezernierte Faktoren in das angrenzende Gewebe diffundieren und dort zytokinvermittelt zu einer STAT3-Aktivierung führen.

Ohnehin werden bei den Biopsien durch die heterogene Zusammensetzung solider Tumoren nicht alleinig Tumorzellen oder gesunde Darmepithelien entnommen, sondern es werden

immer Lymphozyten, kleinste Blutgefäße und mesenchymale Stromazellen mit angeschnitten. Somit erschweren diese bei einer Untersuchung auf Proteinebene mittels Western Blot die Auswertung.

Zur genauen Lokalisation der aktivierten STAT3-Proteine im Tumor würden sich immunhistochemische Färbemethoden der Gewebe unter Hinzunahme von spezifischen phospho-STAT3-Antikörpern eignen. Durch solche Verfahren konnte z.B. intranukleäres STAT3 in Nierenzellkarzinomen (Horiguchi et al. 2002) oder in Zellen von Hirntumoren nachgewiesen werden (Schaefer et al. 2000). Kawada *et al.* zeigten durch Kernfärbungen, dass STAT3 vor allem in der Peripherie des Tumorgewebes von humanen, kolorektalen Tumorbiopsien phosphoryliert im Kern vorliegt (Kawada et al. 2006).

In jüngster Zeit gibt es mehr und mehr interessante Befunde über die wahrscheinliche Rolle von STAT3 in Immunzellen, die im Untersuchungsmaterial sicherlich mit angeschnitten wurden. Scheinbar entfaltet STAT3 seine malignitätsassoziierten Wirkungen, indem es für die Produktion immunsuppressiver Faktoren sorgt, die wiederum STAT3 in diversen Immunzellpopulationen aktivieren (Yu et al. 2007).

Neuere Studien haben gezeigt, dass vor allem regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>-Zellen) eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Mikromilieus des Tumors spielen (Zou 2005). T<sub>Reg</sub>-Zellen, die über eine erhöhte STAT3-Aktivität, verglichen mit ihren Milz-abgeleiteten Ebenbildern verfügen, akkumulieren selektiv innerhalb des Tumors und machen im Mausmodell die Mehrzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Spätstadium der Tumorprogression aus. Sie inhibieren effizient Immunantworten, die durch zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) vermittelt werden, indem sie deren IFN $\gamma$ -Produktion unterdrücken (Yu et al. 2007).

Erste Anzeichen dafür, dass STAT3-Aktivität im Tumorstroma zu einer T<sub>Reg</sub>-Anhäufung im Tumor führen, stammen aus einer Studie, in der STAT3 in hämatopoetischen Zellen tumortragender Mäuse ausgeschaltet wurde. Dies führte im Folgenden zu einer T<sub>Reg</sub>-Reduktion und einer verstärkten Einwanderung zytotoxischer T-Zellen (Kortylewski et al. 2005). Somit sind wahrscheinlich nicht ausschließlich die angeschnittenen Tumorzellen für die detektierte STAT3 Aktivität verantwortlich und STAT3-Aktivität im Randgewebe kann von der auch dort stattfindenden Immunantwort herrühren.

In der untransformierten Darmschleimhaut gibt es aber auch physiologische Prozesse, die für eine STAT3-Aktivität verantwortlich sein könnten. Da Zellen der Darmschleimhaut durchschnittlich innerhalb von 2-5 Tagen vollständig ausgetauscht werden, ist es ein Gewebe mit ausgeprägter regenerativer Potenz (Junqueira und Carneiro 1996), dessen

Transkription proliferationsfördernder und Zelldifferenzierungsfördernder Gene durchaus STAT3-vermittelt sein könnte. Anzeichen dafür lieferten unter anderem Ergebnisse zur selektiven STAT3-Inaktivierung im Kolonepithel von Mäusen, wobei die Mäuse durch die resultierende Störung der Schleimhauthomöostase eine fulminante Enterokolitis erlitten (Alonzi et al. 2004).

STAT3 könnte im Randgewebe auch andere Funktionen erfüllen als im Tumor, da von einer gewebeabhängigen Aktivierung von STAT3-Zielgenen ausgegangen werden kann. Bei der Involution der Brustdrüse induziert STAT3 beispielsweise Apoptose, während seine Aktivierung in Keratinozyten, Zellen der myeloischen Reihe und im frühen Stadium des malignen Melanoms einen Übergang von Proliferation zur Zelldifferenzierung bewirkt (Levy und Lee 2002, Hauser et al. 1998, Minami et al. 1996, Flørenes et al. 1999). Obwohl STAT3 in CRC-abgeleiteten Xenograft-Tumoren in Mäusen im frühen Stadium begünstigend auf das Tumorstadium einzuwirken scheint (Corvinus et al. 2005), ist es interessant, dass in vorangegangenen Untersuchungen von C. Orth die STAT3-Aktivität im kolorektalen Karzinom mit steigendem Tumorgrad abnimmt. Hier könnten möglicherweise Selektionsvorgänge gegen pro-apoptotisches STAT3 in höheren Tumorgraden der Karzinome bedeutsam sein (Orth 2003). Bei den von Kawada *et al.* untersuchten Biopsien korreliert nukleäres pSTAT3 signifikant mit der lymphatischen Invasion, der vaskulären Invasion und dem Tumor-Lymphknoten-Metastasierungsstatus (TNM), aber nicht mit dem Tumorstadium (Kawada et al. 2006). Abweichend davon zeigten eigene Untersuchungen an Tumormustern kolorektaler Karzinome weder signifikante Korrelation des Tumorgrades, noch des Tumor-, Lymphknoten-, oder Metastasierungsstadiums mit vorhandener STAT3-Phosphorylierung im Tumorgewebe. Im Randgewebe hingegen konnte zumindest eine signifikante negativ lineare Korrelation der STAT3-Phosphorylierung mit dem Tumorgrad gefunden werden. Dabei ist jedoch anzumerken, dass Kawada *et al.* zwar über deutlich mehr (90) Tumormustern verfügten, jedoch lediglich den  $\chi^2$ -Test zur Bestimmung möglicher Zusammenhänge benutzten, wobei es nicht möglich ist, eine Richtung der Abhängigkeit zu bestimmen, wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsanalysen. Zudem wurde das Tumorgewebe dort in zentral gelegenes und peripher gelegenes Tumorgewebe eingeteilt und ausschließlich die STAT3-Phosphorylierung des Kernes untersucht, wobei dies im eigenen Untersuchungsmaterial bereits gemischt vorlag, was schwächere Expressionen erklären dürfte.



## 6.2 Mechanismen der STAT3-Aktivierung im kolorektalen Karzinom

Wie bereits ausgeführt wurde, gibt es für die STAT3-Aktivierung in jedem Gewebe andere Mechanismen und selbst innerhalb eines Gewebes können diese vielfältig sein. Um den STAT3-Aktivierungsmechanismus im kolorektalen Karzinom näher zu beleuchten, wurden 34 Tumorbiospien und 64 CRC-Zelllinien auf ihre STAT3-, Src- und JAK-Signalaktivität untersucht, sowie in einer ausgewählten Zelllinie (C-10) spezifische Inhibitionsversuche durchgeführt. Korrelationsanalysen zwischen dem Aktivierungsstatus verschiedener Tyrosinkinasen und der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in den Biospien des Tumorgewebes konnten keine signifikanten Zusammenhänge liefern. Abhängigkeitsanalysen mittels  $\chi^2$ -Test bei den Zelllinien zeigten hingegen Abhängigkeitsbeziehungen zwischen der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 mit pSrc sowie pJAK2. Somit ist auch im kolorektalen Karzinom von heterogenen STAT3-Aktivierungswegen auszugehen. Wie Expressionskontrollen des Androgenrezeptors im Prostatakarzinom (Chen et al. 2000) oder des Östrogenrezeptors in Mammakarzinomzellen (Yamamoto et al. 2000) zeigten, kann STAT3 Signalwege der Steroidhormone beeinflussen. Durch Koimmunpräzipitation konnten sogar direkte Interaktionen des Glukokortikoidrezeptors mit STAT3 belegt werden (Zhang et al. 1997).

Im Randgewebe der Biospien scheint die STAT3-Aktivierung jedoch vor allem durch tyrosinphosphoryliertes Src vermittelt zu sein, da sich hier eine positive lineare Korrelation herstellen ließ.

Wie in Brustkrebszellen gezeigt wurde, können Src und JAK dort kooperieren, um STAT3-Aktivität herbeizuführen. In einigen Brustkrebszelllinien sind sogar beide nötig gewesen, um eine maximale STAT3-Aktivierung und -DNA-Bindung herbeizuführen, was im Folgenden wieder zu einer erhöhten Kinaseaktivität führte (Garcia et al. 2001).

Interessanterweise zeigten eigene Untersuchungen eine signifikante Korrelation zwischen der Src-Phosphorylierung und der JAK1-Expression im Tumor- wie auch im Randgewebe. Auch in CRC abgeleiteten Zelllinien scheint es eine Abhängigkeitsbeziehung zwischen der Phosphorylierung von JAK2 und der von Src zu geben. Viele der hier untersuchten CRC-Zelllinien zeigten aber auch nur ein minimales Ausmaß von Tyrosinphosphorylierung. Dieser Befund erinnert an die Beobachtung, dass einige Zellen ihre konstitutive STAT3-Aktivität durch Inkulturnahme verlieren, diese aber durch Implantation in Nacktmäuse oder durch Stimulation mit IL-6 wieder zurückgewinnen können (Corvinus et al. 2005). Darum müsste es

prinzipiell möglich sein, dass andere Signalmoleküle ähnliches bewirken können. Dass eine IL-6 Stimulation in den darauf untersuchten Zelllinien wieder zur STAT3 Aktivierung führt, deutet ebenso wie die Abhängigkeitsanalyse in den CRC-Zelllinien auf eine in vielen Fällen durch JAKs mediierte Signalkaskade hin (Corvinus et al. 2005).

Weitere Untersuchungen an den CRC-Biopsien, beschäftigten sich mit der Frage, ob es eine Korrelation der Expression eines Signalmediators im Tumorgewebe mit der Expression desselben Signalmediators im zugehörigen Randgewebe gibt. Dabei konnte gezeigt werden, dass dies für STAT3 sowie die Phosphorylierung von Src in starkem Maße zutrifft. Die Befunde sprechen dafür, dass es im CRC funktionelle Interaktionen des Tumors mit seinem umliegenden Gewebe gibt.

Trotzdem bleibt die Frage offen, ob es im CRC dennoch Unterschiede in der STAT3-Funktion zwischen Tumor- und Randgewebe gibt, da die Wechselbeziehungen von STAT3 mit anderen Signalwegen sehr vielseitig sind und damit der jeweilige Zelltyp STAT3 in seiner Funktion beeinflussen kann. So interagiert beispielsweise der Wnt-Signalweg auf mehreren Ebenen mit dem STAT3-Signalweg. Sowohl die Transkriptionsfaktoren Tcf (T-cell factor)-4 und Lef (Lymphoid enhancer factor)-4 (Yamashita et al. 2002), als auch mutierte APC-Proteine (Norris et al. 2000) können mit STAT3 zusammenwirken und dadurch die Expression zellzyklusbeeinflussender Gene (z.B. c-myc oder Cyclin D) modulieren (Kolligs et al. 2002). Laut Kawada *et al.* gibt es eine signifikante Korrelation zwischen pSTAT3- und  $\beta$ -Catenin-Auftreten im Kern, wobei sich die Koexpression von nukleärem  $\beta$ -Catenin und nukleärem p-STAT3 negativ auf die Überlebensrate der Patienten auswirkt. In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 ist die STAT3-Phosphorylierung für die Kerntranslokation von  $\beta$ -Catenin aus dem Zytoplasma notwendig, transportiert es jedoch nicht selbst in den Kern und beeinflusst auch nicht seine Expression. Auch die Interaktionen zwischen  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin bleiben unbeeinflusst. STAT3-Aktivierung beeinflusst dennoch den Wnt-Signalweg, indem die Transkription durch  $\beta$ -Catenin und Tcf supprimiert wird. In den CRC-Zelllinien HT-29 oder LoVo hat die STAT3-Phosphorylierung jedoch keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin Kerntranslokation (Kawada et al. 2006).

Diese Vielzahl der Folgen der STAT3 Aktivierung allein in verschiedenen CRC Zelllinien lässt erahnen, wie mannigfaltig diese Zusammenhänge erst in einem großen Patientenkollektiv sein dürften.

Ein Weg genauere Informationen über die Aktivität von STAT3-Interaktionspartnern sowie deren Aktivierungswege im kolorektalen Karzinom zu erhalten, ist die Verwendung spezifischer Inhibitionen von STAT3 oder seiner Interaktionspartner. Der Vielfalt möglicher

Interaktionen kann dabei durch Einbeziehung einer größeren Zahl CRC-abgeleiteter Zelllinien Rechnung getragen werden. Ein Anfang wurde in dieser Arbeit durch Inhibition verschiedener Signalparameter in der CRC-Zelllinie C-10 gemacht. Dabei führte eine direkte Inhibition der STAT3-Dimerisierung durch das STAT3-Inhibitorpeptid OMT in den C-10-Zellen konzentrationsabhängig zum Zelltod. Eine Inhibition von Januskinasen führte indirekt zur Inhibition der STAT3-Phosphorylierung, konnte jedoch weder eine Abnahme der Proliferation noch Zytotoxizität bewirken.

Auch eine STAT3-Inhibition in den CRC-Zelllinien HT-29 und SW1116 durch eine dominant negative STAT3-Variante oder den JAK-Inhibitor AG490 konnte zwar die Proliferation supprimieren, hatte jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf das Zellüberleben (Xiong et al. 2008).

Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, dass eine fehlende STAT3-Dimerisierung beziehungsweise die fehlende DNA-Bindung ein Signal für den Zelltod dieser Krebszellen darstellt, oder dass zumindest Signale für das Überleben ausbleiben. Unphosphoryliertes STAT3 übt jedoch scheinbar immer noch Funktionen aus, die das Überleben der Zelle sichern. Yang und Stark beschreiben die Möglichkeit, dass auch unphosphorylierte STAT3-Moleküle an die DNA binden können, um dort die Gentranskription zu initiieren, wodurch die Transkription jedoch langsamer abläuft als mit phosphoryliertem STAT3 (Yang und Stark 2008).

Merkwürdigerweise konnte eine Veränderung der JAK-Phosphorylierung durch die JAK-Inhibition nicht detektiert werden, wobei sich die phospho-JAK-Detektion generell schwierig in den selbst kultivierten C-10 Zellen gestaltete. Ein Erklärungsansatz liegt sicher in den Lysebedingungen: In den hier verwendeten Zelllysaten, die von einem anderen Labor unter Verwendung eines anderen Lysepuffer hergestellt worden waren, fiel die phospho-JAK-Detektion deutlich leichter, als in den selbst lysierten Zellen und Biopsien.

Es wäre auch möglich, dass bereits geringfügige Tyrosinphosphorylierung der Januskinasen ausreicht, um eine STAT3-Phosphorylierung herbeizuführen und diese geringe JAK-Phosphorylierung nicht detektierbar ist. Dies würde ebenso erklären, weshalb keine signifikante Verminderung der JAK-Phosphorylierung in den C-10 Zellen nach JAK-Inhibition nachgewiesen werden konnte, obwohl eine STAT3-Phosphorylierungshemmung eindeutig zu detektieren war.

Eine Src-Inhibition wiederum führt in den C-10-Zellen lediglich zu einer Wachstumsinhibition, und hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben (Emaduddin et al. 2008) oder die STAT3-Phosphorylierung (eigene Befunde), was darauf schließen lässt, dass in

diesen Zellen die Src-Aktivität nicht ausschlaggebend für das Überleben ist. Um diese Theorien zu verifizieren, wären Untersuchungen zur Expression Apoptose-regulierender Proteine wie beispielsweise Bcl-x<sub>L</sub> oder Survivin in Abhängigkeit zur direkten und indirekten STAT3-Inhibierung notwendig, da deren Expression im CRC mit der des STAT3 korreliert (Lassmann et al. 2007).

Eine Vielzahl von Befunden der letzten Jahre zeigt, dass STAT3 eine wichtige Rolle in der Tumorigenese zukommt. Daher besteht großes Interesse an der Entwicklung spezifischer und effektiver Medikamente, welche in der Lage sind, die STAT3-Aktivierung zu bremsen. Dies können sowohl kleine Moleküle, wie die in der Einleitung beschriebenen Peptidomimetika, aber auch siRNA-basierte Medikamente sein, solange sie sicher im Menschen anwendbar sind (Kortylewski und Yu 2008). Einige Schritte in der Entwicklung solcher Medikamente wurden bereits gemacht.

Kong et al. nutzten den Inhibitor Wp1066, ein niedermolekulares Agens, zur Hemmung der STAT3-Aktivität im zentralnervösen Melanom und in regulatorischen T-Zellen. Der Inhibitor wirkt, indem er die JAK2- und STAT3-Phosphorylierung hemmt und dadurch regulierte Moleküle wie c-Myc und Survivin in ihrer Expression reduziert werden. Die Untersuchungen befinden sich bereits in einer präklinischen Studie zur Bekämpfung des zentralnervösen Melanoms, indem die Wirksamkeit und Toxizität des Inhibitors an Mäusen getestet wird (Kong et al. 2008). WP1066 hat signifikante intrinsische direkte Tumortoxizität und inhibiert pSTAT3 in Immunzellen (Hussain et al. 2007). Bedeutend ist, dass Patienten mit fortgeschrittenen bösartigen Tumoren zutiefst immunsupprimiert sind. Selbst wenn eine systemische Immunantwort generiert würde, könnte sie innerhalb des Tumormikromilieus - über ein reiches Angebot an Faktoren wie T<sub>Regs</sub>, immunsuppressive Zytokine und immunsuppressive Makrophagen - zunichte gemacht werden (Hussain et al. 2006, Fecci et al. 2006, El Andaloussi und Lesniak 2007). Aktiviertes STAT3 führt zur Expression immunsuppressiver Faktoren, indem Th<sub>1</sub>-immunstimulatorische Moleküle inhibiert werden (Kortylewski und Yu 2008). Da nicht nur pSTAT3 in den T<sub>Regs</sub>, sondern auch in Th<sub>17</sub>-Zellen durch Wp1066 gehemmt wird, können sich keine Autoimmunität (Bettelli et al. 2007) und die damit verbundenen gravierenden Nebenwirkungen entwickeln, welche ansonsten durch die Th<sub>17</sub>-Zellen getriggert würden. Eine STAT3-Inhibition in kolorektalen Karzinomzellen mittels siRNA gelang in HT-29 Zellen, wodurch die Invasivität durch Induktion der Anoikis verringert wurde (Fan et al. 2008). Xiong *et al.* zeigten, dass eine Inhibition mit dem JAK-Inhibitor AG490 in den CRC Zelllinien HT-29 und SW1116 zu einer Abnahme der JAK2-Proteinlevels führt, was mit einer Abnahme der pJAK2- und pSTAT3-Level, in geringerem

Maße aber auch der JAK1- und pJAK1-Expression einhergeht. Darum ist es wahrscheinlich, dass sowohl die JAK1- wie die JAK2-Konzentrationen für Abnormalitäten des JAK/STAT-Signalweges in diesen Zelllinien sorgen können. JAK2 scheint daher im kolorektalen Karzinom eine bedeutendere Rolle zu spielen (Xiong et al. 2008), eine Sicht, die auch durch die Untersuchungen in dieser Arbeit unterstützt wird.

Wegen der Heterogenität der Karzinome und der Redundanz der Krebswachstumssignalwege ist die Inhibition multipler kanzerogener Signalwege durchaus wünschenswert. Dazu wäre es sicher sinnvoll, die Tumore von CRC Patienten biochemisch kontrolliert zu untersuchen, um ein besseres Bild über die verschiedenen Varianten der Fehlregulationen zu erhalten und dort gezielt angreifen zu können. Des Weiteren sind genauere Untersuchungen nötig, um zu überprüfen, wie sich eine JAK-Inhibition auf die STAT3-DNA-Bindung auswirkt. Dazu wären zum Beispiel Untersuchungen mittels EMSA oder Luciferase-Assays vorstellbar.

Mit dem STAT3-Inhibitorpeptid OMT wären Versuche zur Bekämpfung des Darmkrebses in Nacktmäusen denkbar. Zunächst müsste jedoch noch sein Einfluss auf gesundes Gewebe getestet werden, zum Beispiel mit einer Fibroblastenkultur, um einen toxischen Einfluss des Inhibitors auszuschließen, sowie Untersuchungen in anderen CRC-Zelllinien durchgeführt werden, um einen Überblick über die Variabilität des Wirkspektrums und eine Einschätzung seiner Spezifität zu bekommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass STAT3 ein attraktives Zielmolekül in der Bekämpfung des kolorektalen Karzinoms auf molekularer Ebene darstellt und es lohnenswert erscheint, die Bemühungen seiner gezielten Ausschaltung sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* zu intensivieren.

## 7. Schlussfolgerungen

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist vielfach sowohl in kolorektalem Tumor- wie auch in nicht entartetem Randgewebe und CRC-Zelllinien aktiviert. Dies konnte mit Analysen zur STAT3-Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden.

Trotz nahezu gleicher STAT3- sowie Src-Expression in den zusammengehörigen Proben aus Tumor- und Randgewebe sind die untersuchten Signalmediatoren im Randgewebe häufiger tyrosinphosphoryliert als im Tumorgewebe.

Eine Korrelationsanalyse nach Pearson zur Untersuchung potentieller linearer Korrelationen der Expression oder Phosphorylierung eines Signalmediators im Tumorgewebe mit der Expression bzw. Phosphorylierung desselben Signalmediators im zugehörigen Randgewebe ergab signifikante positiv lineare Korrelationen für die STAT3-Expression sowie die Phosphorylierung von Src. Dies deutet auf funktionelle Interaktionen zwischen Tumor- und Randgewebe hin.

Der  $\chi^2$ -Test zeigt Abhängigkeitsbeziehungen zwischen der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 mit pSrc sowie pJAK2 in CRC-Zelllinien. Korrelationsanalysen zwischen den verschiedenen phosphorylierten Kinasen und phosphoryliertem STAT3 in den Biopsien des Tumorgewebes konnten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge liefern, woraus sich die Hypothese ableiten ließ, dass im kolorektalen Karzinom von heterogenen STAT3-Aktivierungswegen auszugehen ist.

Signifikante Korrelation zwischen der Src-Phosphorylierung und der JAK1-Expression im Tumor- wie auch im Randgewebe, sowie Abhängigkeitsbeziehung zwischen der Phosphorylierung von JAK2 und der von Src in CRC-Zelllinien könnten auf ein Kooperieren der beiden Signalparameter hindeuten.

In C-10-Zellen führt eine direkte Inhibition der STAT3-Dimerisierung durch das STAT3-Inhibitorpeptid OMT konzentrationsabhängig zum Zelltod. Eine Inhibition von Januskinasen in diesen Zellen führt zwar indirekt zur Inhibition der STAT3-Phosphorylierung, kann jedoch weder eine Abnahme der Proliferation noch Zytotoxizität bewirken. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Tyrosinphosphorylierung allein nicht ausschlaggebend ist, sondern

Dimerisierung und DNA-Bindung von STAT3 entscheidend für das Überleben der Zellen sind.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aligayer H, Boyd D, Heiss M, Abdalla E, Curley S, Gallick G. 2002. Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer*, 94 (2):344-351.
- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. 2001. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*, 21 (5):1621-1632.
- Alonzi T, Newton I, Bryce P, Di Carlo E, Lattanzio G, Tripodi M, Musiani P, Poli V. 2004. Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine*, 26 (2):45-56.
- Amit-Vazina M, Shishodia S, Harris D, Van Q, Wang M, Weber D, Alexanian R, Talpaz M, Aggarwal B, Estrov Z. 2005. Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Cancer*, 93 (1):70-80.
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, 350 (23):2343-2351.
- Aoki N, Matsuda T. 2002. A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol Endocrinol*, 16 (1):58-69.
- Berry RD, Paraskeva C. 1988. Expression of carcinoembryonic antigen by adenoma and carcinoma derived epithelial cell lines: possible marker of tumour progression and modulation of expression by sodium butyrate. *Carcinogenesis*, 9 (3):447-450.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, 8 (4):345-350.
- Bienz M. 1999. APC: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev*, 9 (5):595-603.
- Blaskovich M, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sefti S. 2003. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*, 63 (6):1270-1279.
- Bromberg J. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23 (2):161-169.
- Bromberg J, Horvath C, Besser D, Lathem W, Darnell JJ. 1998. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol*, 18 (5):2553-2558.
- Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG, Bodmer WF. 1993. Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (7):2842-2845.
- Bruderlein S, van der Bosch K, Schlag P, Schwab M. 1990. Cytogenetics and DNA amplification in colorectal cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 2 (1):63-70.
- Brugge J, Erikson R. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269 (5626):346-348.
- Burke W, Jin X, Lin H, Huang M, Liu R, Reynolds R, Lin J. 2001. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 20 (55):7925-7934.
- Chapman R, Lourenco P, Tonner E, Flint D, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke A, Watson C. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13 (19):2604-2616.



- Chen T, Wang L, Farrar W. 2000. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 60 (8):2132-2135.
- Chung C, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Coleman Dt, Ren Z, Mandal P, Cameron A, Dyer G, Muranjan S, Campbell M, Chen X, McMurray J. 2005. Investigation of the binding determinants of phosphopeptides targeted to the SRC homology 2 domain of the signal transducer and activator of transcription 3. Development of a high-affinity peptide inhibitor. *J Med Chem*, 48 (21):6661-6670.
- Coll M, Rosen K, Ladedá V, Filmus J. 2002. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene*, 21 (18):2908-2913.
- Corvinus F. 2005.
- Corvinus F, Fitzgerald J, Friedrich K, Markert U. 2003. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*, 50 (4):316-321.
- Corvinus F, Orth C, Moriggl R, Tsareva S, Wagner S, Pfitzner E, Baus D, Kaufmann R, Huber L, Zatloukal K, Beug H, Ohlschlager P, Schütz A, Halbhuber K, Friedrich K. 2005. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 7 (6):545-555.
- Cramer A, Kleiner S, Westermann M, Meissner A, Lange A, Friedrich K. 2005. Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *J Cell Biochem*, 95 (4):805-816.
- Darnell JJ. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277 (5332):1630-1635.
- Darnell JJ. 1998. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*, 18 (8):549-554.
- Dauer D, Ferraro B, Song L, Yu B, Mora L, Buettner R, Enkemann S, Jove R, Haura E. 2005. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*, 24 (21):3397-3408.
- Deng J, Grande F, Neamati N. 2007. Small molecule inhibitors of Stat3 signaling pathway. *Curr Cancer Drug Targets*, 7 (1):91-107.
- Dhir R, Ni Z, Lou W, DeMiguel F, Grandis J, Gao A. 2002. Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate*, 51 (4):241-246.
- Dourlat J, Valentin B, Liu W, Garbay C. 2007. New syntheses of tetrazolylmethylphenylalanine and O-malonyltyrosine as pTyr mimetics for the design of STAT3 dimerization inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 17 (14):3943-3946.
- Duncan S, Zhong Z, Wen Z, Darnell JJ. 1997. STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn*, 208 (2):190-198.
- El Andaloussi A, Lesniak M. 2007. CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *J Neurooncol*, 83 (2):145-152.
- Emaduddin M, Bicknell D, Bodmer W, Feller S. 2008. Cell growth, global phosphotyrosine elevation, and c-Met phosphorylation through Src family kinases in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (7):2358-2362.
- Eriksen K, Kaltoft K, Mikkelsen G, Nielsen M, Zhang Q, Geisler C, Nissen M, Röpke C, Wasik M, Odum N. 2001. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia*, 15 (5):787-793.
- Fan Y, Zhang Y, Wu Y, Zhang W, Wang Y, Cheng Z, Li H. 2008. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses

- invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 14 (3):428-434.
- Fecci P, Mitchell D, Whitesides J, Xie W, Friedman A, Archer G, Herndon Jn, Bigner D, Dranoff G, Sampson J. 2006. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res*, 66 (6):3294-3302.
- Flørenes V, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland J, Kerbel R. 1999. Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene*, 18 (4):1023-1032.
- Flowers L, Subramaniam P, Johnson H. 2005. A SOCS-1 peptide mimetic inhibits both constitutive and IL-6 induced activation of STAT3 in prostate cancer cells. *Oncogene*, 24 (12):2114-2120.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 1 (1):55-67.
- Frank D. 1999. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol Med*, 5 (7):432-456.
- Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 5 (5):449-460.
- Gadina M, Hilton D, Johnston J, Morinobu A, Lighvani A, Zhou Y, Visconti R, O'Shea J. 2001. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*, 13 (3):363-373.
- Garcia R, Bowman T, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho C, Cox C, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20 (20):2499-2513.
- Goyette M, Cho K, Fasching C, Levy D, Kinzler K, Paraskeva C, Vogelstein B, Stanbridge E. 1992. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol*, 12 (3):1387-1395.
- Greenhalgh DA, Kinsella AR. 1985. c-Ha-ras not c-Ki-ras activation in three colon tumour cell lines. *Carcinogenesis*, 6 (10):1533-1535.
- Hauser P, Agrawal D, Hackney J, Pledger W. 1998. STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ*, 9 (10):847-855.
- Heinrich P, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 ( Pt 2):297-314.
- Hoey T, Schindler U. 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5):582-587.
- Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M. 2002. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol*, 168 (2):762-765.
- Hussain S, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger A. 2006. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol*, 8 (3):261-279.
- Hussain S, Kong L, Jordan J, Conrad C, Madden T, Fokt I, Priebe W, Heimberger A. 2007. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3

- reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res*, 67 (20):9630-9636.
- Inghirami G, Chiarle R, Simmons W, Piva R, Schlessinger K, Levy D. 2005. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle*, 4 (9):1131-1133.
- Irby R, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau J, Trudeau W, Karl R, Fujita D, Jove R, Yeatman T. 1999. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet*, 21 (2):187-190.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson C, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein D, Penninger J. 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409 (6818):349-354.
- Ishizawa R, Parsons S. 2004. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, 6 (3):209-214.
- Junqueira L, Carneiro J. 1996. Histologie.
- Kappes A. 2000. Untersuchungen zur Expression und Sekretion von apM1, einem komplementähnlichen Faktor aus Fettgewebe [Doktorarbeit]. Regensburg:
- Kawada M, Seno H, Uenoyama Y, Sawabu T, Kanda N, Fukui H, Shimahara Y, Chiba T. 2006. Signal transducers and activators of transcription 3 activation is involved in nuclear accumulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66 (6):2913-2917.
- Kirkland SC. 1985. Dome formation by a human colonic adenocarcinoma cell line (HCA-7). *Cancer Res*, 45 (8):3790-3795.
- Kirkland SC. 1986. Endocrine differentiation by a human rectal adenocarcinoma cell line (HRA-19). *Differentiation*, 33 (2):148-155.
- Kirkland SC, Bailey IG. 1986. Establishment and characterisation of six human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 53 (6):779-785.
- Köhne C, Grothey A, Bokemeyer C, Bontke N, Aapro M. 2001. Chemotherapy in elderly patients with colorectal cancer. *Ann Oncol*, 12 (4):435-442.
- Köhne C HA. 2001. Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms. UNI-MED Verlag:16-17.
- Kolligs F, Bommer G, Göke B. 2002. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66 (3):131-144.
- Kong L, Abou-Ghazal M, Wei J, Chakraborty A, Sun W, Qiao W, Fuller G, Fokt I, Grimm E, Schmittling R, Archer GJ, Sampson J, Priebe W, Heimberger A. 2008. A novel inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 activation is efficacious against established central nervous system melanoma and inhibits regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 14 (18):5759-5768.
- Kortylewski M, Yu H. 2008. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 20 (2):228-233.
- Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mulé J, Kerr W, Jove R, Pardoll D, Yu H. 2005. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 11 (12):1314-1321.
- Lacronique V, Boureux A, Valle V, Poirel H, Quang C, Mauchauffé M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard O. 1997. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 278 (5341):1309-1312.
- Lassmann S, Schuster I, Walch A, Göbel H, Jütting U, Makowiec F, Hopt U, Werner M. 2007. STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. *J Clin Pathol*, 60 (2):173-179.
- Levy D, Lee C. 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109 (9):1143-1148.

- Liu C, Zhou S, Ke C, Li N, Wu R. 2007. [Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappaB and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression]. *Ai Zheng*, 26 (9):929-936.
- Liu Y, Bodmer WF. 2006. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (4):976-981.
- McBain JA, Weese JL, Meisner LF, Wolberg WH, Willson JK. 1984. Establishment and characterization of human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res*, 44 (12 Pt 1):5813-5821.
- Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S. 1996. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (9):3963-3966.
- Mizoguchi M, Betensky R, Batchelor T, Bernay D, Louis D, Nutt C. 2006. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (12):1181-1188.
- Moss S, Liu T, Petrotos A, Hsu T, Gold L, Holt P. 1996. Inward growth of colonic adenomatous polyps. *Gastroenterology*, 111 (6):1425-1432.
- Mueller K, Hunter L, Ethier S, Boerner J. 2008. Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res*, 68 (9):3314-3322.
- Narayan S, Roy D. 2003. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*, 2:41.
- Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt S, Gabrilovich D. 2005. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res*, 65 (20):9525-9535.
- Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Röpke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N. 1997. Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (13):6764-6769.
- Norris A, Clissold P, Askham J, Morrison E, Moncur P, McCall S, Coletta P, Meredith D, Markham A. 2000. Truncated adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor protein can undergo tyrosine phosphorylation. *Eur J Cancer*, 36 (4):525-532.
- Opdam F, Kamp M, de Bruijn R, Roos E. 2004. Jak kinase activity is required for lymphoma invasion and metastasis. *Oncogene*, 23 (39):6647-6653.
- Orth C. 2003. Aktivität von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie im kolorektalen Karzinom [Doktorarbeit ].
- Park J, Meisler A, Cartwright C. 1993. c-Yes tyrosine kinase activity in human colon carcinoma. *Oncogene*, 8 (10):2627-2635.
- Paukku K, Silvennoinen O. 2004. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15 (6):435-455.
- Pedranzini L, Dechow T, Berishaj M, Comenzo R, Zhou P, Azare J, Bornmann W, Bromberg J. 2006. Pyridone 6, a pan-Janus-activated kinase inhibitor, induces growth inhibition of multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 66 (19):9714-9721.
- Porschen R, Arkenau H, Kubicka S, Greil R, Seufferlein T, Freier W, Kretzschmar A, Graeven U, Grothey A, Hinke A, Schmiegel W, Schmoll H. 2007. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol*, 25 (27):4217-4223.

- Rahimi N, Hung W, Tremblay E, Saulnier R, Elliott B. 1998. c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*, 273 (50):33714-33721.
- Rane S, Reddy E. 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, 19 (49):5662-5679.
- Robert Koch Institut GdEKiDeV. 2008. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends., 6. überarbeitete Auflage.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J*, 18 (17):4657-4668.
- Schaefer L, Menter D, Schaefer T. 2000. Activation of stat3 and stat1 DNA binding and transcriptional activity in human brain tumour cell lines by gp130 cytokines. *Cell Signal*, 12 (3):143-151.
- Schmiegel W. 1999. Ergebnisse einer interdisziplinären Konsensuskonferenz im Auftrag der DGVS unter der Schirmherrschaft der Deutschen Krebsgesellschaft Bochum:
- Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy D. 1993. Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science*, 261 (5129):1736-1739.
- Solic N, Collins JE, Richter A, Holt SJ, Campbell I, Alexander P, Davies DE. 1995. Two newly established cell lines derived from the same colonic adenocarcinoma exhibit differences in EGF-receptor ligand and adhesion molecule expression. *Int J Cancer*, 62 (1):48-57.
- Song H, Sondak V, Barber D, Reid T, Lin J. 2004. Modulation of Janus kinase 2 by cisplatin in cancer cells. *Int J Oncol*, 24 (4):1017-1026.
- Stanbridge E. 1990. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Science*, 247 (4938):12-13.
- Summy J, Gallick G. 2003. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 22 (4):337-358.
- Tabernero. 2008. #A47 [Poster]. ASCO GI 2008:
- ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, 22 (16):5662-5668.
- Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson D, Carbone D, Paul W, Berzofsky J. 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*, 1 (6):515-520.
- Thomas S, Brugge J. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:513-609.
- Tsareva S, Moriggl R, Corvinus F, Wiederanders B, Schütz A, Kovacic B, Friedrich K. 2007. Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction. *Neoplasia*, 9 (4):279-291.
- Turkson J, Jove R. 2000. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 19 (56):6613-6626.
- Turkson J, Ryan D, Kim J, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebt S, Hamilton A, Jove R. 2001. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*, 276 (48):45443-45455.
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon J, Van Laethem J, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado R. 2007. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 25 (13):1658-1664.

- Veillette A, Foss F, Sausville E, Bolen J, Rosen N. 1987. Expression of the lck tyrosine kinase gene in human colon carcinoma and other non-lymphoid human tumor cell lines. *Oncogene Res*, 1 (4):357-374.
- Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A, Bos J. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319 (9):525-532.
- Watkins JF, Sanger C. 1977. Properties of a cell line from human adenocarcinoma of the rectum. *Br J Cancer*, 35 (6):785-794.
- Watson C, Miller W. 1995. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 71 (4):840-844.
- Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. 1999. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (18):10296-10301.
- Whitehead RH, Jones JK, Gabriel A, Lukies RE. 1987. A new colon carcinoma cell line (LIM1863) that grows as organoids with spontaneous differentiation into crypt-like structures in vitro. *Cancer Res*, 47 (10):2683-2689.
- Windham T, Parikh N, Siwak D, Summy J, McConkey D, Kraker A, Gallick G. 2002. Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines. *Oncogene*, 21 (51):7797-7807.
- Xiong H, Zhang Z, Tian X, Sun D, Liang Q, Zhang Y, Lu R, Chen Y, Fang J. 2008. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*, 10 (3):287-297.
- Yamamoto T, Matsuda T, Junicho A, Kishi H, Saatcioglu F, Muraguchi A. 2000. Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and estrogen receptor signaling. *FEBS Lett*, 486 (2):143-148.
- Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N, Matsuda T. 2002. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 297 (4):811-817.
- Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, Shimizu T, Fujii R, Schier A, Hirano T. 2002. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell*, 2 (3):363-375.
- Yang J, Stark G. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res*, 18 (4):443-451.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*, 18:143-164.
- Yu C, Meyer D, Campbell G, Larner A, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 269 (5220):81-83.
- Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7 (1):41-51.
- Zhang X, Wrzeszczynska M, Horvath C, Darnell JJ. 1999. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 19 (10):7138-7146.
- Zhang Z, Jones S, Hagood J, Fuentes N, Fuller G. 1997. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem*, 272 (49):30607-30610.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JJ. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264 (5155):95-98.

Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5 (4):263-274.

## **9. Anhang**

### **9.1 Kongreßbeitrag**

Schmitz M, Tsareva S A, Stein F, Emaduddin M, Feller S M, Friedrich K. Correlation of malignancy parameters in colorectal carcinoma with up- and downstream signalling partners of STAT3. 12<sup>th</sup> Meeting of the Signal Transduction Society Weimar. Poster presentation November 2008.



## 9.2 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Karlheinz Friedrich, dass er mir diese Arbeit anvertraut hat. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung bei jeglicher Art von Anträgen und Präsentationen, wie auch für die endlose Geduld bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Vielen Dank an Martin Schmidt für die Anregungen zur quantitativen Auswertung der Western Blots.

Dank gilt auch dem Institut für medizinische Statistik des Universitätsklinikums Jena für die Beratung zur statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Katrin Röser und Andreas Borowski danke ich für die freundliche Einarbeitung während der Anfangszeit.

Herzlichen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe: Andreas Borowski, Andreas Wohlmann, Anne Müller, Constance Zugowski, Franziska Briest, Frauke Zellmann Katrin Röser, Katrin Sebastian, Sebastian Krause und Uwe Wolf für die allgemeine Hilfsbereitschaft, die gute Laune bei der Arbeit und den Spaß den es gemacht hat mit Euch zu arbeiten.

Vielen Dank auch den freundlichen Praktikanten: Frank Stein, Magdalena Michael, Stefanie Hahn und Raimund Nagel für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen im Rahmen ihres Praktikums.

Ich danke Stephan Feller für die freundliche Kooperation, die Kollektion an lysierten Zelllinien und für die zur Verfügung gestellten C-10-Zellen.

Danke an Jennifer Dourlat für die Bereitstellung ihres STAT3-Inhibitor- und Kontrollpeptides.

Vielen Dank an Alexander Pupyshev für das zur Verfügung gestellte Biopsiematerial.

Dem IZKF möchte ich für das Promotionsstipendium, das mir erlaubte mich ein Semester intensiv der Doktorarbeit zu widmen danken.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, dass sie mir das Medizinstudium ermöglichen, mich in allen Lebenslagen unterstützen und natürlich auch für die Korrektur meiner Rechtschreibfehler und die Hilfe bei der Formatierung.

Vielen Dank Elke für das ausdauernde Korrekturlesen.

Danke Matthias, dass Du einfach immer für mich da bist und mir immer zur Seite stehst.

## **9.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Die Dissertation habe ich selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts wurde ich unterstützt von Herrn Prof. Dr. Dr. Karlheinz Friedrich vom Institut für Biochemie II.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation habe ich bisher weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht, noch habe ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 07.06.2012

Marie Rauschel